

**Populationsdynamik mariner
ölabbauender Mikroorganismengemeinschaften**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Christoph Gertler
aus Peine

1. Referent: Professor Dr. Kenneth Nigel Timmis
2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn
eingereicht am: 31.01.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am: 29.04.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch Professor Dr. Kenneth N. Timmis, den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

keine

Tagungsbeiträge

“Community Dynamics and "Ecogenomics" of Marine Heavy Fuel Oil (HFO) Degrading Organisms regarding Biostimulation and Bioaugmentation”; (Poster)
European Bioperspectives, Wiesbaden, 10. Mai 2005 und
BlueBioNet Congress, Bremerhaven, 14. Juni 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Die Havarie der „Pallas“	4
1.2 Öl als essentieller Energieträger und schwerwiegender Schadstoff	6
1.3 Transport von Öl über das Meer und Ölverschmutzungen	7
1.4 Chemische und physikalische Veränderungen von Öl im Meer	10
1.5 Massnahmen zur Bekämpfung von Ölverschmutzungen im Meer	16
1.6 Natürlicher Abbau von Ölverschmutzungen und Bioremediation	19
1.7 Hydrocarbonoclastische Bakterien und obligate kohlenwasserstoffabbauende Mikroorganismen	25
1.8 Mikrobielle Gemeinschaften und ölabbauende Konsortien	28
1.9 Ziel dieser Studie	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Mikrokosmenversuche zur Anwendung von Ölbindemitteln	31
2.2 Mesokosmenversuche zur Anwendbarkeit biotechnologischer Reinigungsverfahren mittels biologischen Ölabbau	33
2.3 Mikrokosmenversuche zur Ermittlung der Auswirkung von Grazing auf den marinen Ölabbau (Predationsmikrokosmen)	39
2.4 Versuche zur Lagerung von Biomasse ölabbauender mikrobieller Gemeinschaften	41
2.5 Licht-/Phasenkontrastmikroskopie und Zellzählungen	42
2.6 Sauerstoffmessungen mittels Sauerstoffelektrode	43
2.7 Sauerstoffmessungen nach Winkler (Modifikation nach Grasshoff und Kalle) ⁷²	43
2.8 Photometrische Bestimmung der Konzentrationen gelöster Nährstoffe nach Grasshoff ¹³⁶	44
2.9 Fluorimetrische Bestimmung der Konzentrationen gelöster DNA mittels PicoGreen	45
2.10 Filtration von Biomasse aus Mikrokosmenflüssigkeit	46
2.11 Modifizierte Phenol-Chloroform-Extraktion nach Wichels ⁷³	46
2.12 Extraktion bakterieller DNA von Ölbindemittel-Oberflächen	47
2.13 Extraktion eukaryotischer DNA aus Mikrokosmen/Mesokosmen-Flüssigkeit	47
2.14 Extraktion bakterieller RNA aus Mikrokosmen/Mesokosmen-Flüssigkeit sowie von Ölbindemittel-Oberflächen	48
2.15 Saure Phenol-Chloroform-Extraktion zur Abtrennung von DNA-Kontaminationen in RNA- Extraktionen	48
2.16 Reverse Transkription bakterieller RNA aus Mikrokosmen/Mesokosmen-Flüssigkeit sowie von Ölbindemittel-Oberflächen	49
2.17 PCR-Amplifikation von bakterieller DNA für die Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) nach Ranjard et al. ^{74,75}	50
2.18 PCR-Amplifikation von bakterieller DNA für die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) nach Muyzer et al. ⁷⁶	50
2.19 PCR-Amplifikation von eukaryotischer DNA für die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) nach Diéz et al. ⁷⁷	52
2.20 Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) prokaryotischer Gemeinschaften nach Ranjard et al. ^{74,75}	52
2.21 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) prokaryotischer Gemeinschaften nach Muyzer et al. ^{73, 76}	53
2.22 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) eukaryotischer Gemeinschaften nach Diéz et al. ⁷⁷	55
2.23 Extraktion und Reamplifikation von DNA aus DGGE-Polyacrylamidgelen	55
2.24 Klonierung von extrahierter DNA aus DGGE-Banden	56
2.25 Sequenzierung von DGGE-Fragmenten der 16S rDNA nach Sanger	57
2.26 Statistische Analyse der RISA-Fingerprintmuster und Multidimensional Scaling Analysis	57
2.27 Erstellung phylogenetischer Bäume mittels Phylip 3.5 und Mega 4.0	58
2.28 Gaschromatographische Analysen von Öl und Ölrückständen	60
2.29 Quantifizierung kultivierbarer ölabbauender mariner Mikroorganismen mittels MPN (Most probable number) – Methode und Sheen screen ⁸⁸	61

3	Ergebnisse	62
3.1	Mikrokosmenstudie - Allgemeine Beobachtungen	62
3.2	Mikrokosmenstudie - Mikroskopische Beobachtungen	64
3.3	Mikrokosmenstudie - Gaschromatographische Analyse von Ölrückständen	67
3.4	Mikrokosmenstudie - Konzentration des gelösten Sauerstoffs und Respiration	69
3.6	Mikrokosmenstudie - DNA-Fingerprinting-Methoden: RISA	75
3.7	Mikrokosmenstudie - Statistische Analyse der Fingerprintmuster und Multidimensional Scaling Analysis (MDS)	79
3.8	Mikrokosmenstudie - DGGE (Denaturierende Gradientengelelektrophorese)	82
3.9	Mesokosmenstudie	89
3.10	Mesokosmenstudie - Allgemeine Beobachtungen:	89
3.11	Mesokosmenstudie – Verlauf der Sauerstoffkonzentrationen	92
3.12	Mesokosmenstudie - Mikroskopische Beobachtungen	94
3.13	Mesokosmenstudie - Chemische Parameter: Nährstoffkonzentrationen	96
3.14	Mesokosmenstudie - Chemische Parameter der Mesokosmen: pH-Wertmessungen	99
3.15	Mesokosmenstudie - Mikroskopische Bestimmung der bakteriellen Zellzahl	100
3.16	Mesokosmenstudie - Modifizierte Messung der Sauerstoffzehrung nach Winkler	102
3.17	Mesokosmenstudie - Gaschromatographische Analyse von Ölrückständen	103
3.18	Mesokosmenstudie - Licht- und Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung von Biofilmen ölabbauender Mikroorganismen	105
3.19	Mesokosmenstudie - Zellzählungen der Protozoen nach Sedgewick-Rafter	108
3.20	Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in Mesokosmos I mittels DGGE	110
3.21	Mesokosmenstudie - Phylogenetische Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften	122
3.22	Mesokosmenstudie - Analyse der eukaryotischen Gemeinschaften mittels DGGE	132
3.23	Predationsmikrokosmen - Untersuchung der Auswirkungen von Grazing durch Protozoen auf ölabbauende Bakterien	139
3.24	Predationsmikrokosmen - Mikroskopische Bestimmung der Zellzahl	141
3.25	Predationsmikrokosmen - Untersuchung der Respirationsrate nach Winkler	144
3.26	Predationsmikrokosmen - Gaschromatographische Analyse von Ölrückständen	147
3.27	Versuche zur Lagerung der Biomasse von <i>Alcanivorax borkumensis</i>	150
4	Diskussion	154
4.1	Mikrokosmenstudie und Rolle von <i>Alcanivorax borkumensis</i>	154
4.2	Scale-up der Mikrokosmen und etablierte Reinigungsmethoden	159
4.3	Mesokosmenstudie: Effizienz einer experimentellen Reinigungsmethode	162
4.4	Ökologie des marinen biologischen Ölabbaus	168
4.5	Populationsdynamik mikrobieller Gemeinschaften in ölkontaminiertem Meerwasser	170
4.6	Predation - Kontrolle ölabbauender Bakteriengemeinschaften durch Grazing	177
4.7	Fazit	185
5	Danksagung	187
6	Literaturverzeichnis:	188

"Das Meer ist alles. Es bedeckt sieben Zehntel der Erde. Sein Atem ist rein und gesund. Es ist eine immense Wüste, wo ein Mann nie alleine ist, in dem er fühlen kann, wie das Leben aller in ihm bebt. Das Meer ist nicht nur ein Behälter für alle die ungeheuren, übernatürlichen Dinge, die darin existieren; es ist nicht nur Bewegung und Liebe; es ist die lebende Unendlichkeit."

Jules Gabriel Verne (1828 – 1905); 20.000 Meilen unter den Meeren (1870)

1. Einleitung

1.1 Die Havarie der „Pallas“

Seit den Anfängen der Industrialisierung im 19. Jahrhundert ist die Nordsee zu einem der wichtigsten und meistbefahrenen Gewässer auf dem Planeten Erde geworden. Trotz der immer fortschreitenden Verkehrsdichte blieben in all diesen Jahren die Küsten des Wattenmeeres, dieses äusserst sensiblen Küstenabschnitts zwischen Den Helder an der holländischen Küste bis hin nach Esbjerg in Dänemark vor größeren Schäden durch Schiffsunglücke verschont.

In den Morgenstunden des 25. November 1998 erreichte eine Meldung den Meldekopf für Schiffshavarien in Cuxhaven: Der unter der Flagge der Bahamas und mit Schnittholz beladen in Richtung Casablanca fahrende Frachter „Pallas“ war in Brand geraten. Das Schiff war jedoch bereits von der dänischen Küstenwache in Schlepp genommen und Löschmassnahmen eingeleitet worden. Eine Anfrage der deutschen Küstenwache, ob Hilfe benötigt werde, wurde von dänischen Behörden verneint. In den Morgenstunden des 26. Novembers erreichte die führerlose und brennende „Pallas“ wenige Seemeilen westlich zwischen den Inseln Rømø und Sylt die deutschen Hoheitsgewässer. Während der Nacht wurden die Besatzung evakuiert und erfolglose Schleppversuche unternommen. Die dänische Küstenwache erklärte nach kurzer Lagemeldung, dass mit dem Passieren der Grenze ihre Zuständigkeit erlösche. Infolge dieser Übergabe der Zuständigkeit kam es zu einer Kette von Fehlentscheidungen und unglücklichen Zufällen, die zur größten Krise des deutschen Küstenschutzes führte. So betitelte der „Spiegel“ mit den Worten „Fast schon Sabotage“ eine versuchte Rettungsaktion des Havaristen: Nach Übernahme der führerlosen „Pallas“ wurden zwei kurz vor dem Unglück in Dienst gestellte bundeseigene Mehrzweckschiffe, die „Mellum“ und die „Neuwerk“ geschickt, um das Schiff zu Löschen und ins Schlepp zu nehmen. Beide Schiffe sind Kompromisslösungen, die sowohl Seezeichen legen, Öl bekämpfen, Eis brechen, Schleppen als auch Küstenschutzaufgaben übernehmen können. Durch diese Vielfalt an Einsatzmöglichkeiten blieben jedoch die Fähigkeiten als Hochseeschlepper auf der Strecke. Aufgrund mangelnder Abstimmung der verantwortlichen Stellen auf Landes- und Bundesebene wurde der einzig taugliche Hochseeschlepper – die 13200 PS starke „Oceanic“, die jedoch von der Hamburger Reederei Bugsier permanent angemietet wird – zu einem weniger dringlichen Notfall abkommandiert. Nach zwei Tagen vergeblicher Schleppversuche bei aufkommendem Sturm traf auch dieses Schiff beim Havaristen ein, konnte jedoch aufgrund seines zu großen Tiefgangs nicht mehr eingreifen. Am 30. November lief die „Pallas“ etwa 5 Kilometer vor der Insel Amrum auf Grund.¹

Der durch den Brand geschwächte und im Sturm beschädigte Rumpf zerbarst und 500 Tonnen des Schifftreibstoffs – Bunker C – Schweröl - traten in die Nordsee aus.



Abb. 1.1: Der ausgebrannte und auf Grund gelaufene Holzfrachter „Pallas“²

In den folgenden Tagen erreichten Ölteppiche die Inseln Amrum und Föhr. Erst 16 Tage nach dem Ausbrechen des Brandes gelang es in einer wagemutigen Aktion niederländischen Spezialisten das Schiff durch Flutung der Laderäume zu löschen. Das angeschwemmte Öl wurde trotz umfangreicher Rettungs- und Reinigungsversuche 12.000 Seevögeln zum Verhängnis.

Diese Ereignisse führten wie bei den Havarien der „Amoco Cadiz“ oder der „Exxon Valdez“ zu einer beispiellosen Reaktion der Medien; so wurde von Fahrlässigkeit² berichtet, Verantwortliche in den Behörden von Land und Bund gesucht und die schlechte Kommunikation von dänischen und deutschen Behörden angeprangert. Bedingt durch die mediale Berichterstattung meldeten sich viele Freiwillige – unterstützt durch eine von einem Mineralölkonzern gelieferte Reinigungsanlage – zur Säuberung der ölverschmutzten Seevögel. In der Tat verursachte der „Pallas“-Zwischenfall aber relativ geringe Schäden. Zwar sind etwa 500 Tonnen Öl aus dem Schiff ausgetreten und hat die Strände der Inseln Amrum und Föhr verschmutzt. Angelandetes Öl wurde relativ schnell von den Stränden abgetragen, verbliebenes Öl aus der Pallas gepumpt und das Wrack der „Pallas“ innerhalb weniger Monate durch Demontage der Deckaufbauten und Sprengung des Rumpfes entfernt. In der Folge wurden die Sicherheitsbestimmungen für die Schifffahrt im Bereich der Nordsee verschärft, bauliche Massnahmen wie Doppelhüllen für Tankschiffe angeordnet und die Koordination von Bergungs- und Seenotrettungsaktionen im Bereich der deutschen Bucht auf das neu gegründete Havariekommando Cuxhaven zentralisiert.¹

Bereits wenige Wochen nach dem Unglück berichtet die „Berliner Zeitung“:

(...) Sechs Wochen nach der Havarie der "Pallas" vor Amrum pumpen Profis aus Holland weiter Öl aus dem Wrack. Der starke Seegang verursachte neue Risse in den Bordwänden, sie sind aber nicht bedrohlich. Routinemäßiges Abwickeln eines Ölunfalls. Die verkohlte und verschmierte Holzladung wird auf Amrum gebracht. Dort haben sich viele emotionale Wogen gelegt. Ebenso der Medienrummel. (...) Die "Pallas" wird die Politik noch einige Zeit beschäftigen. Dafür wollen auch die Umweltschützer sorgen. "Das ist ein lauter Warnschuß", sagt Hans-Ulrich Rösner vom WWF. Man müsse nun über den Meeresschutz allgemein diskutieren. Sicher, rund 12 000 tote Entenvögel seien ein herber Verlust für den Nationalpark. "Aber das führt zu keiner Gefährdung irgendeiner Art", so Rösner. Diese Zahl entspricht den natürlichen Populationsschwankungen.

Im vergangenen Winter seien vor der dänischen Küste bei Esbjerg mindestens 4000 Enten nach Öleinleitungen von Schiffen gestorben – in Deutschland sei diese Nachricht kaum aufgenommen worden. Der Öltod in der Nordsee - makaber, aber alltäglich. Es fehle immer noch an wirksamen Mitteln gegen die schleichende Ölpest, verursacht durch illegales Verklappen von Altöl auf See, sagt Rösner. Eine Statistik des Nationalparkamts in Tönning belege, daß die Zahl verölter Vögel zurückging, solange das Entsorgen des Altöls kostenlos gewesen sei. Seit in den Häfen Entsorgungsgebühren für Altöl verlangt werde, steige die Zahl verölter Seevögel wieder an. (...) ³ - Berliner Zeitung, 11.12. 1998

Dieser Artikel steht im starken Gegensatz zu der medialen Berichterstattung zum Zeitpunkt des Unglücks. So befasst sich im Juli 2000 ein weiterer Artikel des „Spiegel“ mit diesem Thema und kritisiert, dass keine Experten befragt wurden, sondern mit vielen Emotionen eine Havarie, wie sie im Seegebiet der deutschen Bucht häufiger vorkommt, unverhältnismässig aufgebauscht wurde, da Umweltangst und Umweltschutz in der letzten Dekade zu einem Politikum geworden seien ⁴.

Dabei deutet insbesondere der oben gezeigte Artikel der Berliner Zeitung auf ein völlig anderes Problem hin: Auch wenn der „Pallas-Schock“ zu wichtigen Veränderungen im Küstenschutz und im Schiffbau geführt haben, liegen die Probleme der Ölverschmutzungen doch eher in kleinen, „alltäglichen“ Verschmutzungen, die in ihrer Gesamtheit erheblichen Schaden anrichten. Auch wenn die Gefahr von grossen Tankerhavarien mit katastrophalen Folgen nach wie vor nicht gebannt sind – wie im Falle des Tankers „Prestige“ an der nordspanischen Küste im Jahre 2003 deutlich erkennbar war – so liegt das statistisch gesehen größere Problem in Tankerterminals, Sporthäfen und in den Bilgenwassertanks von Frachtschiffen. Jedoch werden durch die Berichterstattung in den Medien seltene, große Unfälle mit Ölverschmutzungen überbewertet, das Ausmass der allgemeinen Verschmutzung der Meere mit Kohlenwasserstoffen hingegen unterschätzt oder von der Öffentlichkeit gar nicht wahrgenommen.

Ferner hat die „Pallas“-Havarie ein wesentliches Problem aufgezeigt: Die für die Bergungsaktion eingesetzten Schiffe „Mellum“ und „Neuwerk“ gehören mit je 45.000.000 € Baukosten zu den teuersten und modernsten im Küstenschutz eingesetzten Mehrzweckschiffen und sollten sowohl für die Bergung von Havaristen als auch für die Ölbekämpfung hervorragend geeignet sein. Dennoch konnten die Schiffe bei aufkommendem Sturm in den flachen Gewässern vor Amrum nicht mehr eingesetzt werden. Dies zeigt die Grenzen der technologischen Bekämpfung von Öl im Meer und stellt die Frage, wie diese Lücken im Küstenschutz geschlossen werden können. ^{2, 1}

1.2 Öl als essentieller Energieträger und schwerwiegender Schadstoff

Wie von keinem anderen Rohstoff hängen globale Wirtschaft, technische Entwicklung und strategische Interessen auf der Welt ab wie von Öl. Dies betrifft nicht nur die Produktion von alltäglichen Gegenständen aus Kunststoffen oder die Energieversorgung, sondern auch essentielle Bereiche, wie beispielsweise die moderne Landwirtschaft. Durch Automatisierung und Gebrauch von Maschinen sowie den Einsatz von Kunstdüngern und Pestiziden konnten die Produktionsmengen von Lebensmitteln in den letzten 50 Jahren erheblich gesteigert werden. Die Kühlung und Konservierung von Nahrungsmitteln erlaubten darüber hinaus lange Transportwege und Lagerungszeiten. Neben der

Nahrungsmittelproduktion hängen aber auch die Trinkwasseraufbereitung sowie die Energieproduktion durch andere Energieträger von diesem fossilen Brennstoff ab⁵.

Grund für diesen Zusammenhang ist zum einen die Verwendung von Öl als Basis für Kunststoffe und schlicht als Energieträger, aber vor allen als Garant des Güterverkehrs und der individuellen Mobilität – fast 90% des Öls werden in Form von Benzin, Kerosin und Leichtölen in Kraftfahrzeugen, Flugzeugen und Schiffen verbrannt – und Triebfeder des als Globalisierung bezeichneten Prozesses der weltweiten wirtschaftlichen Verflechtung.

Insbesondere die letztgenannte Globalisierung hat in der letzten Dekade zu einer rapiden Industrialisierung von Schwellenländern und Ländern der dritten Welt wie zum Beispiel Indien und China geführt, die durch einen steigenden Energiebedarf und erhöhtes Import- wie Exportaufkommen große Mengen dieses Rohstoffes konsumieren. Dabei scheint das Fördermaximum – „Peak Oil“ genannt - des Rohöls auf der Erde in absehbarer Zeit erreicht zu werden. Um den globalen Energiebedarf weiterhin decken zu können, werden insbesondere die Fördermengen der vorhandenen Ölquellen stetig erhöht, da ein steigender Ölpreis die Weltwirtschaft erheblich schädigen kann. Parallel dazu hat eine Suche nach neuen Öllagerstätten in bislang nicht untersuchten Regionen der Erde begonnen. Diese Suche zeigte, dass vor allem in den Polarregionen noch erhebliche Ölreserven vorhanden sind, die im Zuge der globalen Erwärmung innerhalb der nächsten Dekaden verfügbar werden. Somit scheint sicher, dass der steigende Energiebedarf auch in den nächsten Dekaden über den Energieträger Öl gedeckt werden kann, wobei jedoch zwingend die Fördermengen steigen werden⁶.

1.3 Transport von Öl über das Meer und Ölverschmutzungen

Bedingt durch die Entfernungen der Hauptförderländer des Rohöls – Saudi-Arabien, Russland und Venezuela zu den Hauptverbraucherländern – USA, Kanada, Europäische Union, Japan und China – ergeben sich große Distanzen, die überbrückt werden müssen. So wurden 3,4 Milliarden Tonnen dieses Energieträgers im Jahr 2003 gefördert, von denen 2 Milliarden Tonnen über die Ozeane transportiert wurden. Die Haupttransportrouten verlaufen vom Persischen Golf durch die Sulu-See in Richtung China und Japan, von den venezuelanischen Ölfeldern durch die Karibik nach Nordamerika, sowie von der Arabischen Halbinsel um das Kap der guten Hoffnung und die Nordsee nach Nord- und Mitteleuropa⁷. In der letzten Dekade wurde ferner der Schiffsverkehr von den russischen Häfen durch die Ostsee verstärkt. Berücksichtigt man neben den Hauptverkehrsrouten der Tanker auch den Schiffsverkehr durch Frachter und Containerschiffe, so bilden der Persische Golf, die Sulu-See zwischen Sumatra und Indonesien sowie die Nordsee die am dichtesten befahrenen Schifffahrtsrouten der Welt.

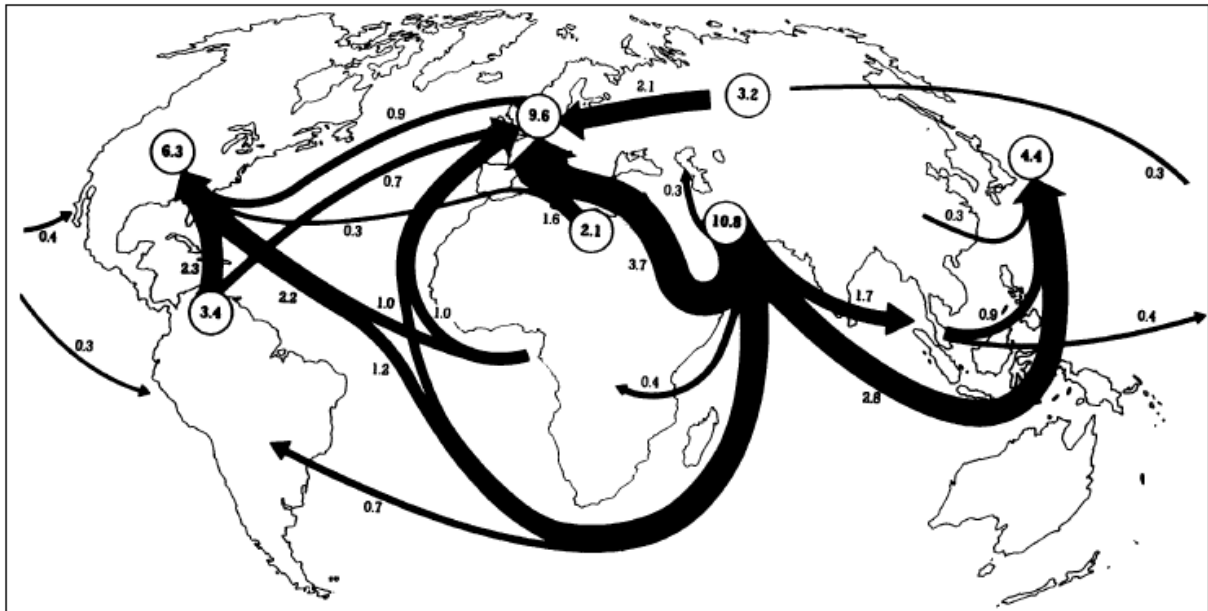


Abb. 1.2: Haupttransportrouten von mit Rohöl beladenen Tankschiffen über die Weltmeere; die angegebenen Zahlen entsprechen einer Menge von Millionen barrel pro Tag und bezieht sich auf 1987.⁸

Der Transport von Ölen wird dabei durch eine weltweite Flotte von über 10.000 Tankschiffen mit einer Gesamttonnage von knapp 350.000 Millionen Bruttoregistertonnen (BRT) bewältigt. Das Durchschnittsalter der Schiffe liegt dabei bei 18,2 Jahren⁹. Erstaunlicherweise verbessert sich die Lage der Tankschiffahrt seit den letzten 20 Jahren stetig. So sinkt das Durchschnittsalter der Tankerflotten, was aber hauptsächlich darauf zurückzuführen ist, dass durch den allgemeinen Boom der Seeschifffahrt in den letzten fünf Jahren sehr viele Neubauten geordert wurden. So vergrößert sich die Tankschifflotte jedes Jahr um 2%. Eine ebenfalls positive Entwicklung ist der Rückgang der Einhüllentanker, bei denen geladenes Öl und Meer nur durch eine wenige Zentimeter dicke Aussenhülle getrennt sind⁹.

Diese Entwicklungen haben nicht nur zu einem Rückgang der großen Tankerunglücke sondern auch zur Reduzierung der Verschmutzung der Meere durch Öl geführt. Während in den 1970er Jahren 3,1 Millionen Tonnen Öl infolge von Tankerunglücken ins Meer gelangten, wurde diese Menge in den folgenden Dekaden auf je 1,1 Mio. t reduziert. Zwischen 2000 und 2004 gelangten durch Tankerunglücke sogar nur mehr 145.000 t Öl in die Weltmeere⁷.

In der Tat bilden Tanker nur einen sehr kleinen Teil der Handelsflotte, und Schiffsunglücke durch Frachter und Containerschiffe treten daher erheblich häufiger auf. Ferner sind die Auflagen und Sicherheitsbestimmungen für Frachtschiffe sehr viel geringer. Die Bundesstelle für Seeschifffahrt konnte so in ihrer Jahresstatistik zeigen, dass 38% aller Schiffsunglücke in deutschen Hoheitsgewässern auf Frachtschiffe entfallen, mehr als die Hälfte davon auf große Frachter von mehr als 5000 BRT. Nur etwa 7% auf Tanker, wobei der Anteil an Unfällen mit großen Öltankern sich auf 0,32% belief¹⁰.

Da Frachtschiffe jedoch auch nicht unerhebliche Mengen an Treibstoffen mit sich führen – ein durchschnittliches Frachtschiff verbraucht bis zu 500 kg Treibstoff pro Betriebsstunde und legt damit etwa 35 km zurück, die Seereise von Hamburg nach Hong Kong erfordert somit circa 500.000 kg Treibstoff ¹¹ – kommt es im Falle einer Havarie zu kleineren, lokal begrenzten Verschmutzungen. So wurde durch die Interessenvertretung der Tankerreedereien ITOPF eine Statistik herausgegeben, die eine genaue Aufteilung der registrierten Ölverschmutzungen im Meer von 1974 bis 2003 nach ihren Ursachen aufzeigt.

Tab. 1.I: Ursachen von kleinen, mittelgroßen und großen Ölverschmutzungen durch Tankschiffe im Meer, 1974 – 2003 (ITOPF, 2003) ⁷

<i>Ursache</i>	< 7 t	7 - 700 t	> 700 t	Gesamt
Laden/Entladen	2812	326	30	3168
Bunkern	548	26	0	574
sonst. Betrieb	1177	55	0	1232
Kollisionen	167	274	95	536
Strandung	228	212	114	554
Hüllenbruch	572	88	43	703
Feuer	85	11	29	125
Sonstige	2175	143	24	2342
Gesamt	7764	1135	335	9236

Diese Statistik zeigt, dass kleinere Ölverschmutzungen aus dem regulären Betrieb von Tankschiffen wie dem Entladen und dem Betanken der Schiffe („Bunkern“) resultieren und 23fach häufiger auftreten als große Havarien. Mittelmäßige und große Ölverschmutzungen sind dagegen häufiger das Resultat von Strandungen oder Kollisionen, also Navigationsfehlern oder menschlichem Versagen in der Schiffsführung. Da sich die Daten nur auf die Zahl der Unfälle beziehen, nicht aber die dabei insgesamt freigesetzte Menge Öl aufgeführt ist, lässt sich über den Anteil der einzelnen Unfallursachen am verursachten Schaden nichts genaues sagen. Da in dieser Statistik nur Tankschiffe einbezogen wurden, kann ferner von einer erheblich größeren Zahl an relativ kleinen Verschmutzungen durch die zahlreicheren Frachtschiffe ausgehen. Da Havarien von Frachtschiffen weniger große Mengen an Öl ins Meer freisetzen, wie im Falle der „Pallas“ deutlich geworden ist, tragen Frachtschiffe vor allem durch betriebsbedingte Störungen eher zu einer latenten, von der Öffentlichkeit unbemerkten Verschmutzung der Meere bei. Diese Verschmutzungen konzentrieren sich dabei vor allem auf Häfen und die Hauptschiffahrtsrouten.

Eine Statistik des US-amerikanischen National Research Councils (NRC) hingegen lässt vermuten, dass es sich bei der anthropogenen Verschmutzung der Weltmeere durch Tankschiffe und deren Betrieb nur um die einen Teil der Kohlenwasserstoffeinträge ins Meer handelt ¹².

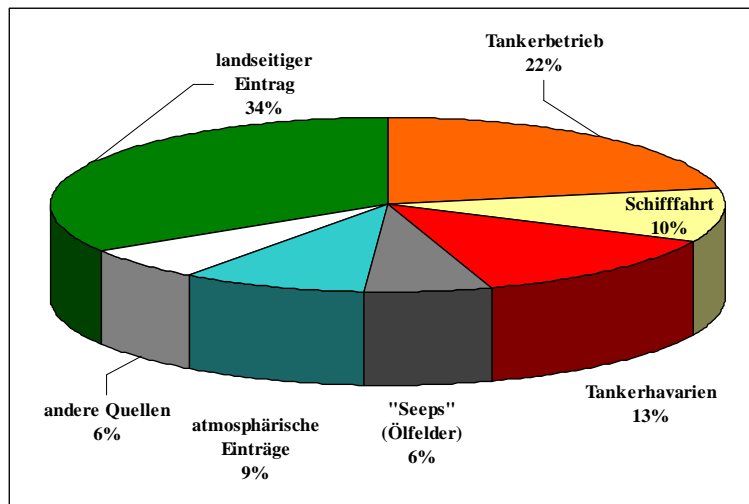


Abb. 1.3: Prozentualer Anteil verschiedener Quellen von Rohölverschmutzungen im Meer im Jahr 1985 ¹²

Wie aus dieser Statistik hervorgeht, sind etwa 45% aller Ölverschmutzungen im Meer auf die Schiffahrt, ein weiteres Drittel auf Einträge durch Flüsse ins Meer und circa 15% auf natürliche Einträge wie beispielsweise „Seeps“ zurückzuführen, Risse in unterseeischen Ölfeldern, durch die Öl ins Wasser gelangen kann. Hierbei ist die Gesamtmenge Öl, die ins Meer gelangt, dennoch sehr groß. Schätzungen der National Academy of Sciences (NAS) für das Jahr 1985 lagen zwischen 1,7 und 8,8 Milliarden Litern Öl weltweit ¹². Zwischen 80 und 200 Millionen Liter dieser Verschmutzungen entfallen auf die Nordsee ¹³. Die gewaltige Wassermenge der Nordsee wies ferner im Jahr 2001 eine durchschnittliche Konzentration von 24,5 mg/l an Ölverschmutzungen auf ¹⁴. Der gesetzliche Grenzwert für Kohlenwasserstoffe in Trinkwasser liegt im Vergleich hierzu bei 9 mg/l.

Diese extrem hohe Konzentration an Kohlenwasserstoffen im Meer kann jedoch auch auf biogene Einflüsse zurückgeführt werden: So produziert ein Teil des Phytoplanktons natürlicherweise Kohlenwasserstoffe. Die Gesamtmenge der durch dieses Plankton produzierten Kohlenwasserstoffe übertrifft dabei die anthropogenen Einträge um das Vier- bis Achtfache ¹⁵. Allerdings wird dieser Eintrag über die gesamten Ozeane verteilt, während anthropogene Verschmutzungen oft lokal und sehr hoch konzentriert auftreten. Nur in seltenen Extremfällen von Algenblüten kommt es zu Umweltschäden durch biogene Kohlenwasserstoffproduktion, wie zum Beispiel im Falle der 1996 aufgetretenen „schwarzen Flecken“ im Wattenmeer ¹⁶.

1.4 Chemische und physikalische Veränderungen von Öl im Meer

Im Falle eines Austritts von Öl ins Meerwasser unterliegt dieses verschiedenen Prozessen, die zu Veränderungen der chemischen Zusammensetzung und den physikalischen Eigenschaften führt. Die Kenntnis dieser Veränderungen ist für die Bekämpfung von Ölverschmutzungen von entscheidendem Interesse, da sich Öle entsprechend ihrer Zusammensetzung völlig unterschiedlich Verhalten und dementsprechend verschiedene Bekämpfungsmethoden erfordern: So sind im Falle ausgetretenen Kerosins oder Diesels nur wenig aufwändige Methoden notwendig, während ausgetretenes Schweröl ein erhebliches Problem darstellt und mit grossem Aufwand bekämpft werden muss.

Rohöl ist ein komplexes Gemisch an organischen chemischen Verbindungen. Es ist durch Zersetzung von Pflanzenmaterial durch anaerobe Bakterien unter hohem Druck und Temperaturen über 50°C und unterirdischen Lagerstätten in Zeiträumen über mehr als 1,5 Millionen Jahre entstanden ¹⁶.

Da sich das Pflanzenmaterial und die Bakterien an den verschiedenen Orten, an denen Öllagerstätten vorliegen, sich stark unterschieden, haben verschiedene Rohöle verschiedene Zusammensetzungen: So enthält „Arabian light“-Rohöl von der Arabischen Halbinsel einen hohen Anteil an kurzkettigen n-Alkanen. Es ist fast transparent und dünnflüssig, enthält viele flüchtige Substanzen und wird zu 90% für die Herstellung von Benzin verwendet. „Alaskan Slope“-Rohöl oder das Nigerianische „Bonny light“-Öl sind zähflüssig, schwarz und enthalten größere Mengen an aromatischen und verzweigten Kohlenwasserstoffen. Zu den Schwerölen zählen die südamerikanischen, indonesischen und asiatischen Rohöle wie zum Beispiel „Jatibarang“ oder „Tia Juana Pesado“¹⁷.

Durch Raffinierung können Rohöle in ihre Bestandteile zerlegt und für verschiedenste Zwecke neu kombiniert werden: Während kurzkettige Alkane wie Hexan und Heptan für Verbrennungsmotoren als Benzin, Diesel oder Kerosin verwendet werden, dienen langkettige Kohlenwasserstoffe entweder als Grundstoff für die chemische Industrie oder als Schmierstoffe. Extrem langkettige und verzweigte Kohlenwasserstoffe sowie aromatische und polyaromatische Kohlenwasserstoffe sammeln sich als Residuen am Boden der Raffinerie-Säulen und werden als Bitumen zum Strassenbau eingesetzt. Über dem Bitumen sammelt sich eine Fraktion zähflüssiger Residualöle, komplexe Mischungen aus langkettigen Alkanen, polyaromatischen Kohlenwasserstoffen und anderen Bestandteilen des Öls, wie zum Beispiel Schwermetallen und Schwefel. Diese werden zusammengefasst zu drei Sorten von Schwerölen, die anhand ihrer Viskosität als Intermediate Fuel Oil (IFO) 80, 180 oder 380 bezeichnet werden. Aufgrund ihrer Zähflüssigkeit können diese Stoffe nur noch als Brennstoff für besonders große Motoren verwendet werden, müssen jedoch zuvor auf mindestens 80°C erhitzt werden. Da Schweröle im Gegensatz zu Dieselmotoren um mehr als 40% günstiger sind, handelt es sich um sehr beliebte Kraftstoffe für Schiffsmotoren. Analog zur seemännischen Bezeichnung für den Treibstofftank eines Schiffes werden diese Öle auch „Bunker C“ genannt.

Entsprechend ihrer Zusammensetzung unterliegen Öle verschiedenen Prozessen im Meerwasser.

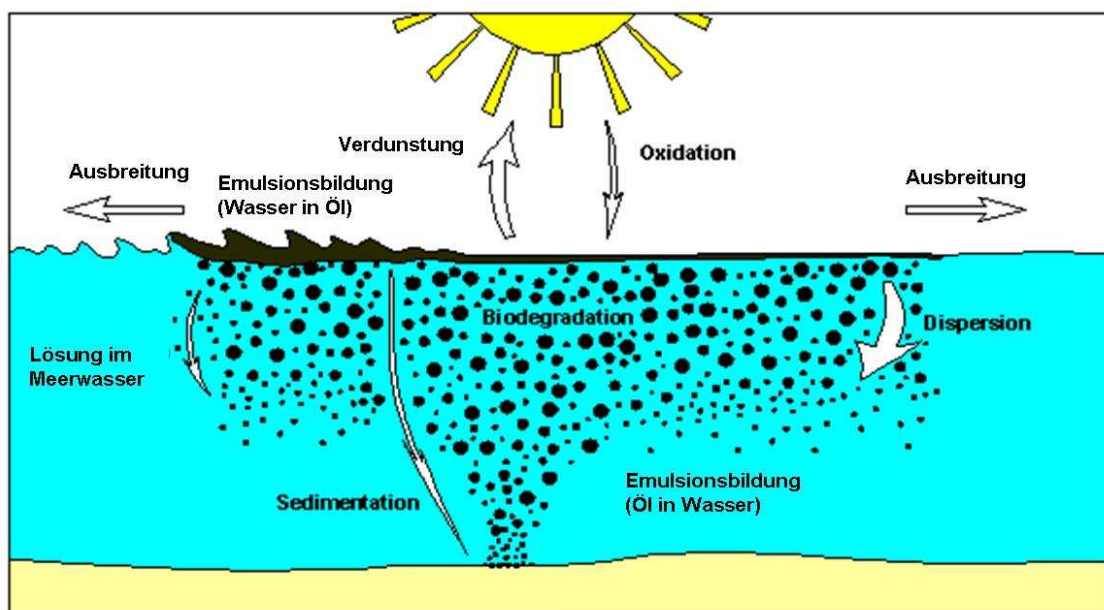


Abb. 1.4: Chemische und physikalische Prozesse, denen Öl im Meerwasser unterliegt¹⁷

Jedes Kohlenwasserstoffgemisch, das ins Wasser gelangt, strebt aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften und Dichte zunächst eine möglichst weite Ausbreitung an. Je nach Viskosität des Gemisches geht dieser Prozess schneller oder langsamer. So bilden zum Beispiel leichte Öle dünne Filme („Sheens“), Schweröle hingegen Ölteppiche mit Schichtdicken von bis zu mehreren Zentimetern aus. Ein weiterer sofort nach dem Auslaufen des Öls eintretender Prozess ist die Verdunstung der flüchtigen Komponenten. Viele Bestandteile des Öls haben Siedepunkte, die zum Teil weit unter den Umgebungstemperaturen liegen. So verdunsten beispielsweise Alkane mit weniger als 14 Kohlenstoffatomen oder aromatische Kohlenwasserstoffe mit einem oder zwei Benzolringen nahezu sofort. Je nach Zusammensetzung kann somit ein großer Teil des Öls bereits nach wenigen Tagen aus der Wassersäule verdunstet sein ¹⁷.

Neben der Verdunstung können Kohlenwasserstoffe, die polare Seitenketten oder funktionale Gruppen enthalten, welche die Wasserlöslichkeit erhöhen, auch direkt im Meerwasser in Lösung gehen.. Ebenso kann durch eine extreme Exposition des Öls gegenüber starkem Sonnenlicht eine Photooxidation einsetzen. Hierdurch können Kohlenwasserstoffe gespalten oder durch Oxidation ebenfalls polare Gruppen in den einzelnen Molekülen entstehen, was zu erhöhter Flüchtigkeit oder Löslichkeit der einzelnen Stoffe führt. Unter der Wasseroberfläche spielen sich weitere Prozesse ab, die das ausgetretene Öl weiter verändern. Ein physikalischer Effekt ist die Dispersion, ein Effekt, der durch den Salzgehalt des Meeres beeinflusst wird und zu einer Aufspaltung des Öls in kleine Tröpfchen führt. Dieser Prozess ist nicht gleichzusetzen mit der Emulsionsbildung oder Emulsifikation, die durch Tenside ausgelöst wird. Auch im Falle der Emulsionsbildung wird das Öl in Tröpfchen (Micellen) aufgespalten, wodurch seine Oberfläche erheblich erhöht wird. Man unterscheidet jedoch zwei unterschiedliche Emulsionen des Öls: Zum einen eine Öl-in-Wasser-Emulsion, die wie gesagt aus kleinen Öltröpfchen im Wasser besteht. Diese Emulsionen können durch mechanische Einwirkungen entstehen, zum Beispiel Wellenschlag, oder aber Bestandteil des natürlichen Ölabbau sein, bei dem Bakterien zunächst mit Hilfe von Biotensiden die Oberfläche des Öls erhöhen um dieses später als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten.

Die zweite Art von Emulsion ist eine Wasser-in-Öl-Emulsion, die erhebliche Schäden anrichten kann: Hierbei löst sich in einem langsamen Prozess Meerwasser im Öl, welches zum Teil hygroskopische Eigenschaften aufweist. Im Laufe dieses Prozesses erhöht sich die Dichte des Öls, was im Falle von Schwerölen zum Absinken des Öls – der Sedimentation – führt. Dieser Prozess erzeugt große Schäden, da das abgesunkene Öl den Meeresboden bedeckt und aufgrund niedriger Temperaturen und geringer Sauerstoffkonzentrationen auch nicht mehr biologisch abgebaut werden kann. Ferner kann abgesunkenes wie auch angelandetes Öl durch Kapillarkräfte tief in das Sediment eindringen und dort lebende Tiere schädigen. ¹⁷

Tabelle 1.II zeigt die Unterschiede in der Ausprägung der oben beschriebenen Prozesse in Abhängigkeit von dem ausgetretenen Öl, geographischen und meteorologischen Besonderheiten sowie eingeleiteten Gegenmassnahmen anhand der Tankerhavarien der „Amoco Cadiz“ und der „Exxon Valdez“.

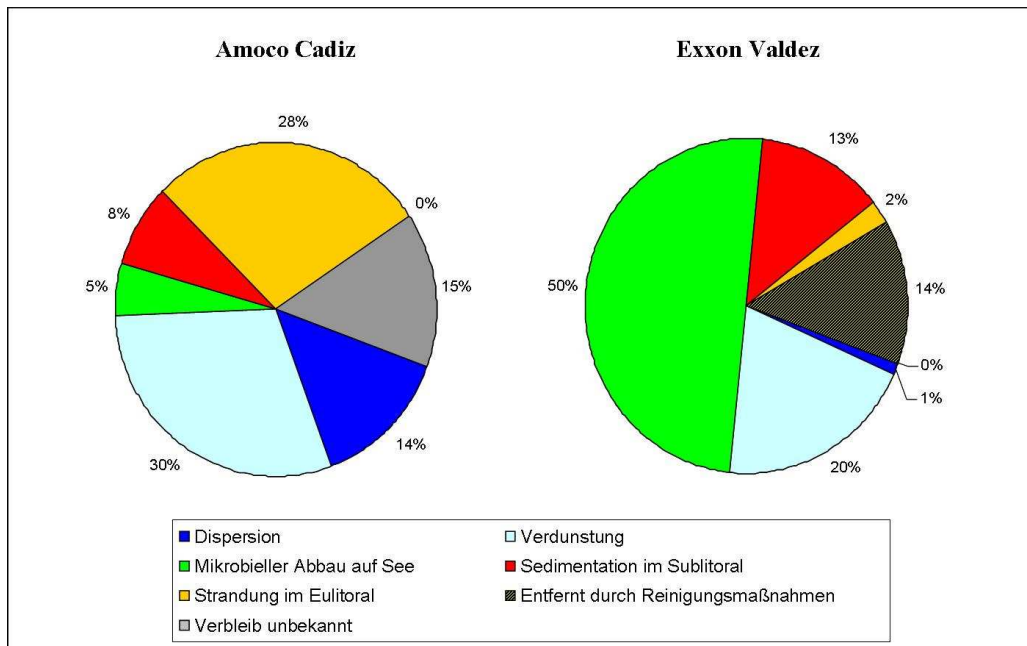


Abb. 1.5: Prozentuale Anteile der entfernten Ölmengen durch verschiedene chemische und physikalische Prozesse sowie durch Reinigungsmaßnahmen und Verbleib von Rückständen im Falle der Havarien der Öltanker „Amoco Cadiz“ 1978 und „Exxon Valdez“ 1991. Prozentangaben beziehen sich auf Anteile an den insgesamt ausgetretenen Massen ¹.

Wie deutlich zu erkennen ist, liegen erhebliche unterschiedliche Ausprägungen der einzelnen Effekte, denen das Öl unterlag, vor. Augenscheinlichster Unterschied ist der enorme Anteil des biologischen Abbaus von Öl im Falle der „Exxon Valdez“-Havarie. Hierbei handelte es sich um ein bislang einmaliges Experiment, bei dem durch Zugabe von Dispergatoren und Düngemitteln der natürliche Abbau des Öls durch Bakterien verstärkt wurde. Im Falle der „Amoco Cadiz“ wurden solche Massnahmen durch fehlenden Wissensstand und die erheblich größere Menge an ausgetretenem Öl – 220.000 Tonnen im Falle der „Amoco Cadiz“ gegenüber 37.000 Tonnen im Falle der „Exxon Valdez“ – nicht durchgeführt. Dies führte nicht zuletzt durch die Überforderung der zuständigen Stellen zu einem erheblich größeren Teil an gestrandetem Öl ¹.

Dennoch sind deutliche Einflüsse der verschiedenen geladenen Öle erkennbar: So wurden 30% der Kohlenwasserstoffe der Amoco Cadiz – Havarie – immerhin 74.000 Tonnen – durch Verdunstung entfernt und 14 % - weitere 32.000 Tonnen - durch Dispergation in die Wassersäule über. Leider wurden bei diesem Zwischenfall zwischen 65 und 85.000 Tonnen Rohöl an die Strände der Bretagne und der Normandie gespült, ferner sedimentierten 8%, fast 20.000 Tonnen, auf den Boden des Ärmelkanals. Im Falle der „Exxon Valdez“ - Katastrophe lag der Verlust durch Verdunstung mit 20% und durch Dispergation mit 1% erheblich niedriger, der Verlust durch Sedimentation trotz aller ergriffenen Massnahmen mit 13 % um fast das doppelte höher. Grund hierfür ist die Ladung beider Tanker: Während die „Amoco Cadiz“ ein nicht näher spezifiziertes arabisches Leichtöl nach Rotterdam transportierte, hatte die „Exxon Valdez“ ein Rohöl aus Ölquellen in Alaska geladen ¹.

Öle werden nach ihrer Viskosität und Dichte anhand des API-Indexes, der umgekehrt proportional zur der Dichte des Öls verläuft, in vier Klassen aufgeteilt: Kohlenwasserstoffgemische mit hohem °API und einer Dichte unter 0,8 g/cm³ wie Kerosin werden in die Gruppe 1 klassifiziert, Gruppe 2 beinhaltet Leichtöle, u.a. „Arabian Light“ mit Dichten von 0,8 bis 0,85 g/cm³, Gruppe 3 europäische und afrikanische Öle mit Dichten von 0,85 bis 0,95 g/cm³ und die Gruppe 4 Schweröle wie indonesisches Rohöl und Bunker C mit einer Dichte über 0,95 g/cm³. Die Abbildung 1.6 zeigt die Verweildauer der einzelnen Gruppen im Meerwasser.¹⁷

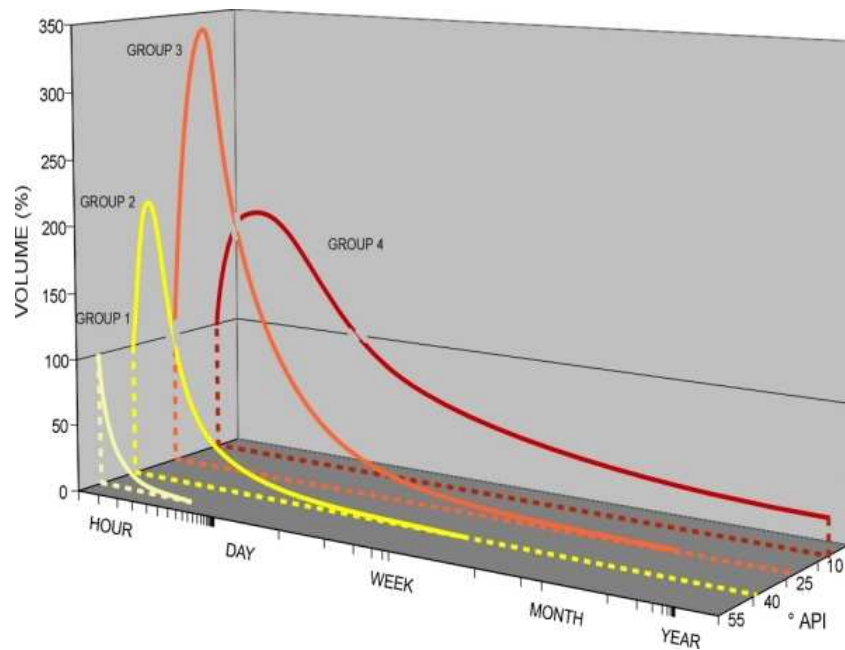


Abb. 1.6: Verweildauer von verschiedenen Ölen im Meerwasser¹⁷

Wie aus der obigen Abbildung hervorgeht sind Benzin und Kerosin oft nur wenige Stunden im Meerwasser nachzuweisen, da ihre Bestandteile hoch flüchtig sind. Leichtöle und mittelschwere Öle zeigen nach dem Austritt zunächst einen Anstieg der Konzentrationen, was auf Dispergation, Lösung und Emulsifikation durch mechanische Einwirkung zurückzuführen ist. Leichtöle werden jedoch vollständig nach wenigen Wochen aus dem Meerwasser entfernt, während mittelschwere Öle bis zu einem Jahr in der Wassersäule verbleiben können.

Ein grosses Problem geht jedoch von den Schwerölen der Gruppe 4 aus, die nicht nur eine extrem lange Verweildauer besitzen sondern auch Bestandteile enthält, die schwer bis nicht biologisch abbaubar sind, zum Beispiel Parafine und polyaromatische Kohlenwasserstoffe. Diese Stoffe verbleiben oft über viele Jahre im Meerwasser oder nach Absinken des Öls am Meeresgrund.

Schweröle stellen vor allem die Ölbekämpfung vor ein erhebliches Problem: Öle wie Bunker C sedimentieren nicht sofort, sondern treiben als dichter Ölteppich über lange Zeiträume im Meerwasser. Ihre hohe Viskosität sorgt dafür, dass eine mechanische Aufspaltung und Dispergation nahezu unmöglich ist. Im Falle von starken Wellenbewegungen und Strömungen, wie zum Beispiel durch einen Sturm, entstehen lange Ölteppiche, die über hunderte Kilometer verdriftet werden und so einen konzentrierten Einsatz von Gegenmassnahmen erschweren¹⁷.

Ferner können auch Monate nach der eigentlichen Havarie Ölteppiche an völlig unerwarteten Orten an die Küste gelangen und dort erhebliche Schäden anrichten. Ein solcher Zwischenfall ereignete sich im Jahre 2003, als der mit 77.000 Tonnen Bunker C beladene Tanker „Prestige“ vor der nordspanischen Küste durch Maschinenschaden in einem Sturm in Seenot geriet. Da die spanischen Behörden ein Anlaufen eines Hafens verweigerten zerbrach die „Prestige“ in zwei Teile, setzte den Großteil ihrer Ladung frei und versank in 4000 m Tiefe. Ein Großteil des Öls bildete einen unregelmässigen, über 100 km langen Ölteppich, der auf hoher See nicht bekämpft werden konnte und einen über 400 km langen Küstenstreifen mit Öl kontaminierte ¹⁸.

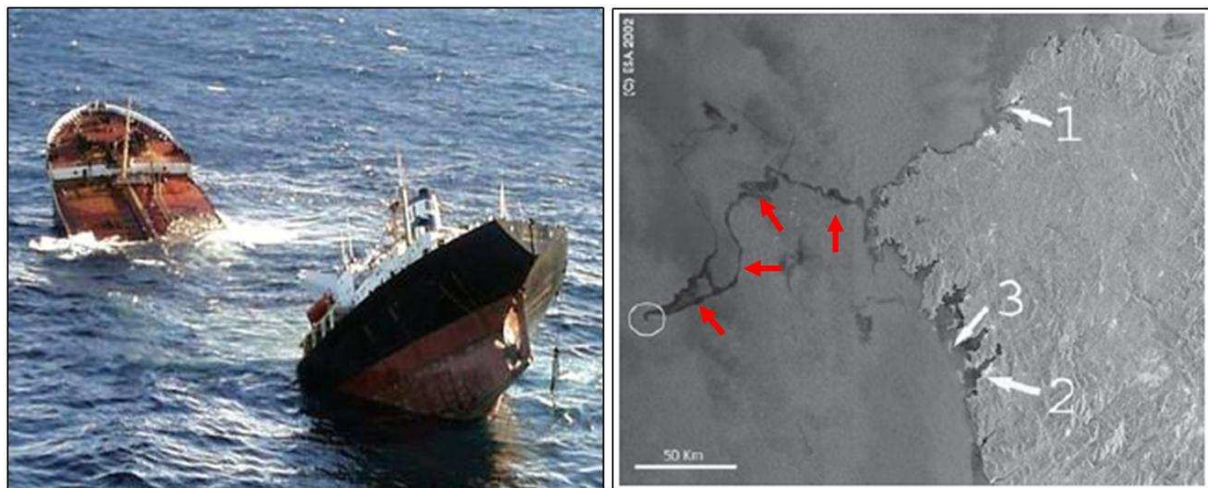


Abb. 1.7: links: Öltanker „Prestige“ unmittelbar vor dem Sinken durch Hüllenbruch infolge eines Sturmschadens (dpa); rechts: rote Pfeile zeigen den Verlauf des Ölteppichs nach der Havarie der „Prestige“ von der Unfallstelle (weißer Kreis) bis zur Nordspanischen Küste. 1 – Mündung des Flusses Ferrol, 2 – Hafenstadt Vigo, 3 – Insel Ons ¹⁸

Obwohl in einer 100 Millionen € teuren Bergungsaktion 13.000 Tonnen Schweröl aus dem Wrack in über 3.500 m Wassertiefe abgepumpt wurden, lecken bis dato Rückstände von bis zu 10 Litern pro Tag aus dem Wrack und verursachen Schäden an der spanischen Küste.

Bereits die Katastrophe der „Amoco Cadiz“ und der „Exxon Valdez“ haben gezeigt, wie wichtig Gegenmassnahmen im Falle einer Ölverschmutzung im Meer sind. Die Havarie der „Prestige“ und der „Pallas“-Zwischenfall zeigten, was für Konsequenzen schlecht organisierte oder mangelhafte Gegenmassnahmen haben können. Im folgenden Teil soll daher auf die gebräuchlichen Methoden der Bekämpfung von Ölverschmutzungen eingegangen werden.

1.5 Massnahmen zur Bekämpfung von Ölverschmutzungen im Meer

Bei der Bekämpfung von Ölverschmutzungen im Meer unterscheidet man zwischen küstennahen und küstenfernen Methoden.

Die küstennahen Methoden werden eingesetzt, wenn eine Eindämmung und Bekämpfung der Ölverschmutzung auf Hochsee nicht möglich war oder unvollständig blieb. Die Konsequenz daraus ist die unmittelbare Bedrohung durch anlandendes oder sedimentierendes Öl. Diese Methoden dienen also der Schadensbegrenzung und Reinigung, wenn präventive Massnahmen versagt haben. In den Massnahmenkatalog gehören in diesem Zusammenhang vor allem technische und mechanische Methoden, deren Einsatz jedoch stark von der Form der jeweiligen Küste abhängt. Ziel aller Methoden ist jedoch die vollständige Entfernung des Öls bei minimalem Schaden an der Küste.

Küstennahe Reinigungsmethoden

Strände und Küstenabschnitte bewegen sich zwischen zwei Extremen, Fels- oder Kiesküsten und Sand- bzw. Wattküsten. Im Regelfall sind Felsküsten relativ einfach zu reinigen: So wird mit Hoch- oder Niederdruckspülgeräten das Öl mithilfe von Tensiden ins Meer gespült oder aufgefangen. Obwohl dies kurzfristig zu einer Bildung relativ giftiger Laugen und Öl-in-Wasser-Emulsionen führt, gelingt es doch meist, Felsküsten vollständig zu reinigen. Ebenso ist die Selbstreinigung sehr erfolgreich, da durch Wellenschlag und Brandung das Öl mechanisch abgewaschen wird und darüber hinaus sehr viel Sauerstoff für den natürlichen Abbau des Öls vorliegt. Sand- und insbesondere Wattküsten hingegen sind sehr problematische Substrate für die Ölbekämpfung: durch die feinen Poren, die zwischen Sandkörnern oder dem feinem Schlick im Watt vorliegen, entstehen starke Kapillarkräfte, durch die Öl tief in den Sand gelangt. Neben den oberflächlichen Verschmutzungen kommt es auch zu Kontaminationen, die sich bis zu einem Meter tief in den Sand oder das Watt fortsetzen. Ein biologischer Abbau ist hier nicht möglich, da bereits wenige Zentimeter unter der Oberfläche kaum noch Sauerstoff verfügbar ist. Die chemische oder manuelle Reinigung ist hingegen wirkungslos, weil die tief im Sand liegenden Verschmutzungen nicht erreicht werden können. In der Regel werden solche Verschmutzungen durch Erdbewegungsmassnahmen entfernt und verbrannt, gelagert oder in Mieten einer biologischen Sanierung unterzogen.¹

Zwei Sonderfälle bieten Mangroven und Salzmarschen. In beiden Ökosystemen ist wegen der hohen Salinität oder geringen Sauerstoffkonzentrationen meist kaum biologischer Abbau möglich. Der Versuch der Reinigung oder mechanischen Beseitigung der Ölverschmutzung führt jedoch zur Zerstörung des jeweiligen Bereiches, weshalb diese Massnahmen meist unterbleiben.¹⁶

Eine alternative Präventionsmassnahme ist die Abschirmung sensibler Bereiche durch Schwimmbarrieren, so genannte „Oil booms“. Diese werden auch auf hoher See zur Eindämmung von Ölteppichen eingesetzt. Ölbarrieren müssen jedoch in diesem Fall eine erhebliche Länge besitzen und können daher nur in strategisch günstigen Regionen, zum Beispiel dem Eingang eines Hafens oder Fjords oder einer Bucht eingesetzt werden. In der Regel sind Ölbarrieren das Mittel der Wahl bei den so genannten küstenfernen Methoden. Diese dienen der Eindämmung und Entfernung des ausgetretenen Öls, bevor dieses sich im Meer ausbreiten und Küsten erreichen kann.¹⁹

Küstenferne Reinigungsmethoden

Die erste in der Regel ergriffene Methode ist das Abpumpen von Öl aus Havaristen durch „Leichter“, kleinere Öltanker. Um den Havaristen oder ausgetretenes Öl werden häufig die bereits oben erwähnten Ölbarrieren ausgelegt. Hierbei handelt es sich meist entweder um drehrunde Festkörpersperren mit circa einem Meter Durchmesser oder aufblasbare Sperren aus Chloropren, einem ölbeständigen Kunststoff. Die deutsche Küstenwache verfügt über Chloroprensperren mit insgesamt 3 km und mehreren schiffgestützten Festkörpersperren von je 1200 m Länge ¹. Dies zeigt deutlich die Grenzen dieses Systems auf: sehr große Ölteppiche, die sich weit ausgedehnt haben, können nicht eingedämmt werden. Ferner sind Ölsperren bei starkem Seegang wirkungslos, weil das Öl über oder unter den Barrieren ins umgebende Meer gelangen kann. Ebenso entstehen Probleme in starken Gezeitenströmungen.

Im Falle einer gelungenen Eindämmung des Öls durch Barrieren erfolgt in einem zweiten Schritt die Entfernung des Öls von der Wasseroberfläche. Hierbei wird möglichst viel Öl unter möglichst geringer Wasseraufnahme von der Oberfläche abgesaugt werden. Für diesen Zweck werden so genannte Skimmer eingesetzt. Diese meist scheibenförmigen Saugschüsseln werden auf die Wasseroberfläche aufgelegt und saugen mit Unterstützung von Hochleistungspumpen die oberste Schicht des Wassers zusammen mit dem darauf treibenden Öl ab. Derzeit verfügt die deutsche Küstenwache über 14 Schiffe, davon sechs hochseetaugliche, mit Skimmer-Systemen, die zwischen 35 und 400 m³ Wasser/Öl-Gemisch pro Stunde aufnehmen und zwischen 430 und 5400 m³ dieses Gemisches aufnehmen können. Durch den Einsatz von Skimmern kann das Öl von der Wasseroberfläche entfernt werden, bevor Wasser in Öl – Emulsionen entstehen und sedimentieren können. Neben den Skimmer-Systemen sind auch hydraulische Schwenkarme mit Saugpumpen in einigen Schiffen installiert, die erhebliche Mengen an Öl von der Oberfläche des Wassers entfernen können. Ferner können zwei Spezialschiffe der Bundesmarine eingesetzt werden, die Öl mittels eines aufklappbaren Rumpfes umschliessen können. Wie aber aus den oben genannten Leistungsdaten hervorgeht, sind sehr große Ölverschmutzungen von 20.000 oder mehr Tonnen Öl schwer bis gar nicht zu bekämpfen. Eine weitere sehr effektive Methode ist daher die Verbrennung des Öls auf hoher See. Hierbei wird das Öl durch Abwurf von Brandbeschleunigern durch Hubschrauber in Brand gesetzt und größtenteils vernichtet. Neben der erheblichen Luftverschmutzung durch diese Methode ist ihr Einsatz auch von einigen anderen Parametern abhängig: So muss das Öl einen relativ hohen Anteil an flüchtigen und leicht brennbaren Kohlenwasserstoffen haben, um gezündet werden zu können, der Ölteppich muss relativ dicht sein und eine Dicke von mindestens 0,8 mm aufweisen, ferner darf kein hoher Seegang vorliegen. Diese Methode wird meist nur unter optimalen äusseren Bedingungen angewandt. ^{1, 19}

Ölbindemittel

Eine bislang wenig beachtete Methode zur Bekämpfung von Ölverschmutzungen könnte eine Lösung dieses Problems bieten: So werden vor allem in Verbindung mit Ölverschmutzungen an Land verschiedenste Ölbindemittel verwendet, um Ölverschmutzungen einzudämmen und den Kontakt von Öl zum Grundwasser zu vermeiden. Neben den kommerziellen Ölbindemitteln auf mineralischer Basis werden auch synthetische Bindemitteln aus Kunststofffasern im industriellen Massstab hergestellt und angeboten.

Neben diesen bereits verfügbaren künstlichen Produkten²² wurden verschiedene Naturprodukte für die Bindung von Kohlenwasserstoffgemischen untersucht²¹. Ein bereits kommerziell verfügbares Produkt besteht im Wesentlichen aus getrocknetem Torf. Darüber hinaus zeigen auch Baumwollfasern sowie Hanf, getrocknetes Reetgrass, und Flachs²⁰ hervorragende Eigenschaften für die Bindung von Öl. Während sich etablierte Methoden hauptsächlich auf die Eindämmung von Öl im Meer und die Entfernung mittels Skimmer und Saugpumpe beschränken erlauben diese Methoden die Bindung von Öl im Wasser. Der Prozess der Ölbindung ist dabei relativ schnell²⁰, so dass eine Bildung von Wasser-in-Öl-Emulsionen vermieden werden kann. Diese Technologie ist für den landseitigen Einsatz zwar schon etabliert und hat die Marktreife erlangt, ebenso ist ein Einsatz im Süßwasser in Form von Filtermaterialien im Versuch geglückt²⁰. Für den Einsatz biologischer Ölbindemittel als Filter- oder Bindemittel im Meerwasser liegen insbesondere für Pflanzenfasern jedoch keine Erfahrungswerte vor. Da es sich jedoch um einen nachwachsenden Rohstoff handelt, der günstig herzustellen ist, in großer Menge verfügbar und dazu ausserdem kohlenstoffdioxidneutral verbrannt werden kann, hat diese Technologie ein erhebliches Potenzial.

Chemische Reinigungsverfahren

Sehr umstritten ist der Einsatz von Chemikalien, so genannten Dispergatoren, für die Bekämpfung von Ölverschmutzungen. Diese Chemikalien wirken wie Tenside und führen zu einer verstärkten Bildung von Öl-in-Wasser-Emulsionen. Die anfangs eingesetzten Dispergatoren wiesen zunächst eine hohe Toxizität auf, weshalb ihr Einsatz höchst umstritten war¹⁶. Obwohl in letzter Zeit weit weniger giftige Dispergatoren verfügbar sind, müssen doch erhebliche Mengen eingesetzt werden, da diese Substanzen wasserlöslich sind und im Meerwasser verdünnt werden¹⁷. Trotz der negativen Auswirkungen auf die empfindlichen Ökosysteme der Küsten werden Dispergatoren dennoch häufig auf hoher See eingesetzt, da der Schaden durch sedimentierende Wasser-in-Öl-Emulsionen den Schaden durch Dispergatoren bei weitem überwiegt¹⁶.

In einigen Studien wurde der Einsatz von Dispergatoren mit großem Erfolg mit Bioremediation, dem natürlichen Abbau von Ölverschmutzungen im Meer kombiniert²³⁻²⁶. Dispergatoren erhöhen die Oberfläche des Öls durch Emulsifikation und damit auch die Bioverfügbarkeit dieses Schadstoffes. Dies ermöglicht im Falle einer guten Versorgung mit Sauerstoff, Nährstoffen und einer hohen Wassertemperatur das Wachstum von Bakterien, die die Kohlenwasserstoffe des Öls als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Diese Schadstoffe werden für den Stoffwechsel der Bakterien benötigt und im Idealfall zu Kohlendioxid, Wasser und Biomasse umgesetzt. Obgleich diese Methode relativ schwer zu kontrollieren ist, handelt es sich um die umweltfreundlichste und gründlichste Methode zur Reinigung von Ölverschmutzungen. Ferner kann die Bioremediation in Gebieten eingesetzt werden, die beispielsweise mit schwerem Gerät oder Schiffen nicht zugänglich sind.

1.6 Natürlicher Abbau von Ölverschmutzungen und Bioremediation

Angesichts der massiven Verschmutzung der Ozeane mit Ölen durch Einleitung über Flüsse, Tankerhavarien, Verschmutzung durch Schiffsverkehr aber auch natürliche Quellen wie „Seeps“ ist es höchst erstaunlich, dass die Ozeane nicht bereits durch von einem Ölfilm überzogen sind. Obwohl ein großer Teil des Öls wie bereits erwähnt verdunstet, in Lösung geht oder sedimentiert sind angesichts von 2 bis 8 Millionen Tonnen Rohöl, die allein im Jahr 1985 in die Ozeane gelangten, sichtbare Effekte dieser Verschmutzung zu erwarten gewesen. So wurde errechnet, dass allein die bis dato erfolgten natürlichen Einflüsse des Öls die Ozeane als eine 20 Moleküle dicke Schicht überziehen müssten²⁷. Offensichtlich verfügen die Ozeane über ein erhebliches Selbstreinigungspotenzial, wie im Falle des 1993 vor den Shetlandinseln havarierten Öltankers „Braer“ klar geworden ist: Ablandige Strömungen haben die 85.000 Tonnen ausgelaufenen Rohöls auf die hohe See getrieben, Ölteppiche wurden durch einen Sturm aufgerissen. Obwohl eine Umweltkatastrophe befürchtet wurde, blieben die Shetlandinseln vor einer „Ölpest“ verschont. Der überwiegende Teil des Öls blieb nach der Havarie erstaunlicherweise verschwunden¹⁷.

Der Grund für diese „Selbstreinigungsfunktion“ des Meeres ist in der Aktivität von Bakterien zu suchen: So wurde bereits durch Söhngen im Jahre 1913 entdeckt²⁸, dass diese Kohlenwasserstoffe als hervorragende Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können. ZoBell stellte 1946 fest, dass diese Fähigkeit unter Bakterien nicht nur weit verbreitet ist, sondern dass die Nutzung von Kohlenwasserstoffgemische durch Mikroorganismen deren Zusammensetzung sowie von der Verfügbarkeit von Nährstoffen wie zum Beispiel Stickstoff und Phosphat abhängt²⁹. Aber erst 21 Jahre nach dieser wichtigen Erkenntnis ergab sich ein potenzielles Anwendungsgebiet für „ölabbauende“ Bakterien: Durch die nach dem 2. Weltkrieg verstärkte Schifffahrt gepaart mit dem immer höheren Bedarf an Öl für Verbrennungsmotoren und als Heizöl ereignete sich 1967 mit der Havarie der „Torrey Canyon“ die erste große Ölverschmutzung²⁹. Gefolgt von immer häufigeren und größeren Tankerhavarien, sowie der Verschmutzung des Meeres durch unterseeische Bohrungen von Bohrinnseln traten zwischen 1970 und 1990 die größten Ölverschmutzungen des Meeres auf. Neben der Verschärfung von Sicherheitsbestimmungen und der Entwicklung erster mechanischer und chemischer Methoden wurden mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt und im Falle der „Torrey Canyon“³⁰, der „Amoco Cadiz“ und der Ölbohrplattform „IXTOC I“³¹ signifikant erhöhte Mengen an Kohlenwasserstoffe abbauenden Bakterien nachgewiesen. Der Abbau von Öl und das Wachstum von ölabbauenden Bakterien konnten somit in Verbindung gebracht werden, was auch eine Erklärung für den hohen Bedarf an Nährstoffen wie Stickstoff und Phosphat erklärte. Neben diesen Elementen zeigten ölabbauende Bakterien auch einen enormen Bedarf an Sauerstoff, was Rückschlüsse auf den Stoffwechselweg, der für die Verwertung der Kohlenwasserstoffe genutzt wird, zulässt³².

Biochemie des biologischen Abbaus von aliphatischen Kohlenwasserstoffen

Die wichtigsten Schritte des Abbaus von Kohlenwasserstoffen werden durch Mono- und Dioxygenasen durchgeführt, die Sauerstoffatome in die Kohlenwasserstoffe einbauen können. In vielen Fällen wird diese Oxidation durch das Cytochrom P450-System durchgeführt, welches auch Oxidationsreaktionen zum Abbau von Pharmaka oder Xenobiotika durchführt. Das P450-System ist daher sowohl innerhalb der Bakterien und der Eukaryoten relativ weit verbreitet^{33, 34, 142}. In tierischen Zellen spielen diese Cytochrome sowohl eine wichtige Rolle bei der Synthese von Steroiden und

Vitamin D als auch beim Abbau von Giftstoffen und Cholesterin. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Veränderung der Wasserlöslichkeit von Giftstoffe oder Pharmaka¹⁴². Cytochrom P450 führt in der Regel eine Reduktion seines Substrats durch zweimalige Übertragung von Elektronen von NADPH und einem Flavoprotein durch. In der Folge wird elementarer Sauerstoff zunächst an ein Eisenatom innerhalb des Enzyms gebunden und darauf an das Substrat angelagert. Der genaue Ablauf dieses Prozess ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Es entsteht im Falle von n-Alkanen als Substraten zunächst ein primärer Alkohol, der sukzessive zu einem Aldehyd und weiter zu einer Carbonsäure reagiert¹⁴². Der Abbau solcher Fettsäuren ist ein weit verbreiteter Stoffwechselweg und erfolgt über die β -Oxidation, in deren Folge die Fettsäuren unter Abspaltung von Acetylresten nach und nach abgebaut werden, sowie den Krebs-Zyklus^{35, 141, 142}. Neben n-Alkanen verfügen diese Cytochrome über ein breites Spektrum und sind häufig auch für die einleitende Oxidation schwer abbaubarer Kohlenwasserstoffe verantwortlich¹⁴¹. Da Cytochrom P450 im Falle von Ölverschmutzungen im Meer eine hohe Aktivität zeigt, wurde diese als Indikator für Ölverschmutzungen im Meer bzw. die Aktivität ölabbauender Bakterien diskutiert¹.

Neben dieser terminalen Oxidation der Kohlenwasserstoffe wurden auch alternative Stoffwechselwege, die zu einem Abbau dieser Stoffe führen, nachgewiesen, jedoch durch andere, z.T. effektivere Enzyme durchgeführt werden. Abb. 1.8 zeigt einige der Reaktionswege.

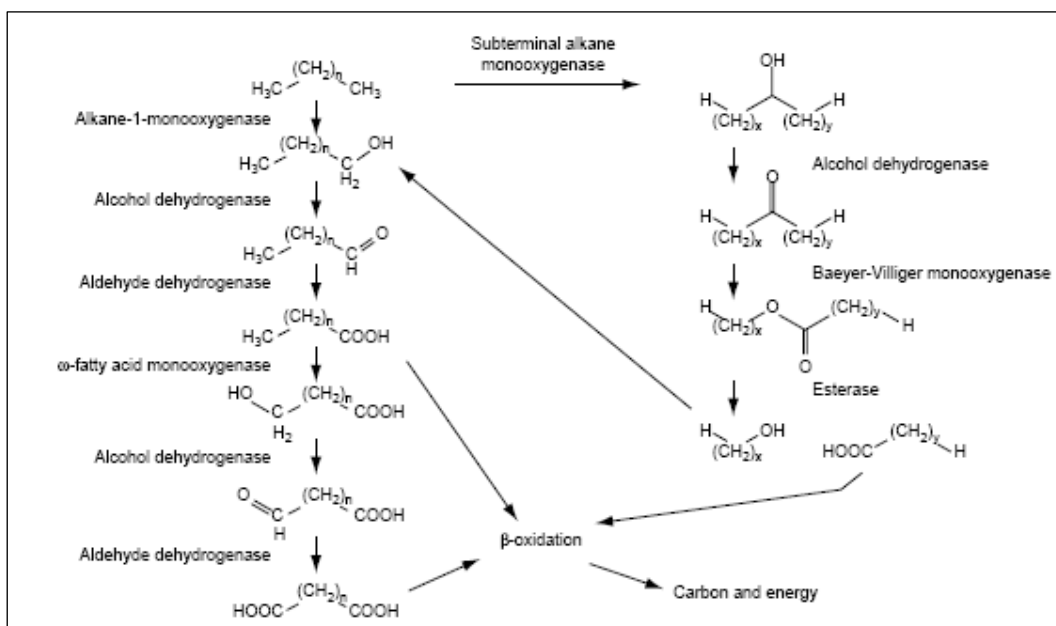


Abb. 1.8: Stoffwechselwege und beteiligte Enzyme des oxidativen Abbaus von linearen gesättigten Kohlenwasserstoffen³³

Solche Stoffwechselwege werden durch Alkanhydroxylasen, einer Klasse spezifischerer Enzyme für den Abbau von Kohlenwasserstoffen, durchgeführt. Diese Biokatalysatoren wurden in allen ölabbauenden Mikroorganismen nachgewiesen. Sie sind häufig in den Zellmembranen der Mikroorganismen verankert und liegen in Komplexen mit anderen Enzymen, zum Beispiel Rubredoxin und Rubredoxinreductase vor, die eine Versorgung mit Elektronen zur Reduktion ihrer Substrate sicherstellen. Ebenso wie im Falle des Cytochrom P450 fügen Alkanhydroxylasen Sauerstoffatome in Form einer OH-Gruppe in Kohlenwasserstoffe ein^{33, 144}. Dabei werden die

Reaktionen wiederum mithilfe von Eisenatomen im aktiven Zentrum dieser Enzyme katalysiert. Alkanhydroxylasen verfügen über ein breites Spektrum von Substraten: so werden nicht nur n-Alkane sondern auch verzweigte und cyclische Alkane und Alkene, substituierte Cycloalkane und Terpene oxidiert. Jedoch enthalten ölabbauende Bakterien mit einem breiten Substratspektrum häufig mehrere Alkanhydroxylase-Systeme, die sich in ihren individuellen Substratspektren unterscheiden¹⁴⁴.

Eine Untersuchung der für Alkanhydroxylasen codierenden *alk*-Gene in einer Zahl von hydrocarbonoclastischen Bakterien zeigte, dass diese Gene häufig in Clustern vorliegen. Van Beilen et al. konnten ferner flankierende Insertionssequenzen an diesen Clustern nachweisen, was darauf hinweist, dass diese Gene möglicherweise als Transposomen agieren können. Hierdurch erhalten diese Cluster von Genen eine hohe Mobilität und können in bakteriellen Populationen zwischen einzelnen Spezies ausgetauscht werden¹⁴³. Dies ermöglicht wiederum eine schnelle Adaptation dieser mikrobiellen Gemeinschaften an den Eintrag von Kohlenwasserstoffen ins Meer. So ist es nicht verwunderlich, dass homologe Alkanhydroxylase-Systeme in einer Vielzahl von unterschiedlichen Bakteriengattungen gefunden worden sind^{27, 143}.

Da nicht nur eine große Zahl an Enzymsystemen für ihre Oxidation und ihren Abbau in der Natur verbreitet sind, zählen aliphatische Alkane zu den leicht abbaubaren Kohlenwasserstoffen. Wesentlich schwieriger ist der Abbau von verzweigten und aromatischen Kohlenwasserstoffen. Im Falle der verzweigten Kohlenwasserstoffe ist zwar meist eine terminale Oxidation möglich, da jedoch an einigen Stellen der Kohlenwasserstoffkette Seitengruppen angelagert sind, wird die β -Oxidation derselben behindert. Der Abbau solcher Stoffe erfolgt dann über weitere Oxidationsschritte innerhalb der Seitenketten⁶¹.

Biochemie des biologischen Abbaus von aromatischen Kohlenwasserstoffen

Cycloalkane und aromatische Kohlenwasserstoffe stellen aufgrund ihrer hohen chemischen Stabilität eine besondere Herausforderung für ölabbauende Bakterien dar: Nur ein Teil dieser Mikroorganismen hat Mechanismen zur Verwertung dieser Stoffe entwickelt. Aromatische Kohlenwasserstoffe wie Benzol können in einem zweistufigen Prozess zu der Dicarbonsäure cis,cis-Muconat umgesetzt werden: In einem ersten Schritt lagert eine Monooxygenase ein Sauerstoffatom an den Benzolring an. Das entstehende Zwischenprodukt reduziert ein Wassermolekül in der Umgebung und bildet Brenzcatechin (1,2 Dihydroxybenzol). Dieser Stoff ist ein typisches Abbauprodukt von aromatischen Kohlenwasserstoffen und kann entweder zu Verbindungen abgebaut werden, die in den Citratzyklus eintreten können, oder aber für den Aufbau aromatischer Verbindungen durch den Organismus genutzt werden. In einem zweiten durch eine Dioxygenase katalysierten Schritt wird molekularer Sauerstoff an die Hydroxygruppen des Brenzcatechins angelagert und somit die Ringstruktur dieses Moleküls geöffnet. Es entsteht Muconat, welches durch die β -Oxidation abgebaut werden kann. Brenzcatechin und die aromatische Dihydroxycarbonsäure Protocatechuat sind so genannte Startersubstrate, die den Abschluss des Abbaus von aromatischen Kohlenwasserstoffen durch oxidative Prozesse darstellen. Große, mehrkernige Aromaten wie Anthracen werden in der Regel durch andere Reaktionen zu diesen beiden einfacheren Verbindungen umgesetzt^{35, 145}. Dies erfordert eine Vielzahl von Reaktionsschritten, weshalb der Abbau von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen meist sehr schwierig und langwierig ist und diese als sehr beständiger Schadstoff oft monate- oder jahrelang in der Umwelt nachgewiesen werden können. Besonders gefährlich sind mittelschwere polyaromatische

Kohlenwasserstoffe mit zwei bis drei Benzolringsystemen. Diese sind relativ schwer abbaubar aber auch teilweise flüchtig oder in Abhängigkeit von Seitenketten oder Substituenten relativ gut wasserlöslich. Der Abbau von Kohlenwasserstoffen ist aber auch unter anaeroben Bedingungen möglich: So können von Bakterien beispielsweise alternative Sauerstoffdonatoren und Elektronenakzeptoren wie Sulfat, Eisen oder Mangan genutzt werden ²⁹. Aromatische Kohlenwasserstoffe können darüber hinaus durch reduktive Ringspaltung abgebaut werden, die keinen molekularen Sauerstoff erfordert ³⁵.

Da Öle aus eine Vielzahl an einzelnen Komponenten besteht, deren Verwertung vielfältige Stoffwechselwege erfordert, gleichzeitig aber auch einen ausgezeichneten Nährstoff darstellt, ist es nicht verwunderlich, dass eine Vielzahl von Organismen die Fähigkeit zum Abbau dieses Stoffgemisches oder seiner Komponenten entwickelt haben. So wurden 79 Arten von Bakterien, 9 Arten von Cyanobakterien, 103 Arten von Pilzen sowie 14 Algen identifiziert, die Kohlenwasserstoffe verwerten können ^{27, 35, 36}. Ferner wurden Archaea-Bakterien mit der Fähigkeit zum Abbau dieser Stoffe in anaeroben Schichten von ölverschmutzten Stränden beobachtet ³⁷, was insofern erstaunlich ist, da Öl erst viele Millionen Jahre nach der erdgeschichtlichen Blütezeit der Archaeae entstanden ist, als bereits infolge des Wachstums von Pflanzen ein hoher Sauerstoffgehalt in der Erdatmosphäre vorlag, der zu einer Verdrängung der Archeae in wenige extreme ökologische Nischen führte.

Die Erkenntnis, dass Öl sehr effektiv durch Mikroorganismen abgebaut werden kann, führte zu der Entwicklung erster Strategien, mit deren Hilfe man ölabbauende Bakterien sinnvoll nutzen kann. Die Methode der „Bioremediation“ nutzt dabei die hervorragenden Eigenschaften von Bakterien, Schadstoffe möglichst umweltschonend und gänzlich aus der Umwelt zu entfernen.

Biologischer Ölabbau und Bioremediation

Im Rahmen dieser Technologie wurden zwei wesentliche Strategien entwickelt: Die „Biostimulation“ hat die Aufgaben, öl- oder schadstoffabbauende Mikroorganismen im Boden mit ausreichenden Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen, so dass ein optimales mikrobielles Wachstum möglich ist und keiner der entscheidenden Nährstoffe dieses limitiert. Für diese Zwecke wurde bereits früh die Anwendung von Langzeitdüngern diskutiert, da eine Zugabe von wasserlöslichen Düngern im Meer zu einer Ausschwemmung derselben und im Boden zu einer unregelmässigen Versorgung der Bakterien führen würde. Langzeitdünger setzen hingegen die einzelnen Nährstoffe relativ gleichmässig über mehrere Wochen oder Tage hinweg frei. Somit kommt es zu einem gleichmässigen Wachstum der Mikroorganismen, ferner bleiben Eutrophierung zu Beginn und Nährstoffmangel in späteren Phasen der jeweiligen Versuche aus. So wurde bereits 1981 ein Langzeitdünger empfohlen, der aus in Parafin eingeschlossenem Harnstoff und Octylphosphat besteht ²⁹.

Die „Bioaugmentation“ hingegen nutzt im Labor gezüchtete Mikroorganismen, die sehr gut für den Abbau des Öls oder anderer Schadstoffe geeignet sind, um die vorhandene mikrobielle Population in der verschmutzten Region zu ergänzen oder ersetzen, in der Absicht eine effektivere und schnellere Reinigung zu erreichen, als dies von der vorhandenen Mikroflora erreicht werden kann.

Obwohl beide Technologien bereits seit dem Beginn der 1980er Jahre diskutiert und teilweise in terrestrischen Habitaten zur Anwendung kamen, wurden diese erst 1991 nach der Havarie des Öltankers „Exxon Valdez“ im Feld eingesetzt. Kernpunkt war der Einsatz des Langzeitdüngers Inipol EAP 22 (Elf Aquitaine), der aus Oleinsäure, Harnstoff, Trilaurylphosphat und Wasser besteht ³⁹ durch

die Firma Exxon auf verölten Küstenstreifen von über 170 km Länge. Parallel dazu wurden auch wasserlösliche Dünger auf die Strände aufgetragen und eine Bioaugmentation mit nicht näher spezifizierten Bakterien unternommen ⁴¹. Auf großen Strandflächen des Prinz-William-Sunds vor der Küste von Alaska wurden stark ölverschmutzte Flächen mit Biostimulation, Bioaugmentation sowie einer Kombination aus beiden Versuchsansätzen behandelt. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, dass vor allem die Biostimulation sehr erfolgreich war und ein großer Teil des Öls in den Versuchsflächen abgebaut wurde ^{40, 41}, während der Einfluss der Bioaugmentation relativ gering war. In der Folge der Bioremediationsversuche mit Inipol EAP 22 wurde jedoch die relativ hohe Toxizität dieses Düngers bemängelt. Inipol EAP 22 enthält mit Trilaurylphosphat nicht nur eine Phosphorquelle sondern auch ein relativ starkes Tensid, welches zwar als Dispergator Öl im Wasser in Lösung bringt und dessen Abbau somit beschleunigt, jedoch gleichzeitig schädliche Auswirkungen auf Meerestiere wie Seeanemonen, Fische und Krebstiere hat ¹⁶.

Seit den Erfolgen der Bioremediation im Falle der „Exxon Valdez“-Havarie wurden daher eine Vielzahl von Versuchen unternommen, die Biostimulation durch Verwendung neuartiger Langzeitdünger weniger toxischer und effektiver zu machen, um Umweltschäden und Eutrophierung zu verhindern. Während bei den Bioremediationsversuchen in Alaska noch empfohlen wurde möglichst viel Dünger aufzubringen, ohne dabei die toxischen Konzentrationen der einzelnen Nährstoffe zu überschreiten ^{42, 43}, wurden in folgenden Studien vor allem versucht von den empirischen Ansätzen der Biostimulation zu einer theoretischen Basis zu gelangen, anhand derer der wirkliche Nährstoffbedarf und die Nährstoffzusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften berechnet oder abgeschätzt werden kann ⁴⁴.

So sollte mithilfe der Resource-Ratio-Theorie ⁴⁵, die Verbrauchsraten und anwesende Mikroorganismen mit dem Ölabbau korreliert, eine Modellierung von Bioremediationsversuchen gelingen. Leider liegen bis dato noch zu wenige Daten aus Labor- und Feldversuchen vor, um verlässliche Modelle für solche Feldversuche zu erstellen. Neben der effektiveren Planung des Düngemiteleinsatzes machen auch neuartige Dünger Biostimulation zu einer Alternative neben etablierten Ölbekämpfungsmethoden. So wurden in einer Studie neuartige Pflanzendünger für die Bioremediation an Stränden verwendet. Durch Ummantelung von anorganischen Nährstoffen mit synthetischen Membranen können diese Dünger kontrolliert in verschiedenen Raten definierte Mengen an Nährstoffen abgeben ⁴⁶. Mit solchen Düngern kann also exakt auf die Menge des Schadstoffs sowie auf die Umweltbedingungen, zum Beispiel langsames Wachstum bei niedrigen Temperaturen reagiert werden. Im Gegensatz zu Düngern wie Inipol EAP 22, der sich relativ unkontrolliert im Meerwasser auflöst und daher häufig während einer Bioremediation mehrfach auf die Ölverschmutzung aufgetragen werden muss, kann bei diesen neuartigen Langzeitdüngern auf diesen Aufwand verzichtet werden. Diese Weiterentwicklungen der Biostimulationstechnik ermöglicht somit eine flexiblere und angepasste Verwendung von Nährstoffen, was zu Steigerungen in der Effizienz dieser Methode führt. Der Einsatz dieser Methode bezog sich bislang hauptsächlich auf angelandetes Öl und somit Bioremediation an Stränden. Nur drei Studien beziehen sich auf Versuche auf offener See, bei der durch Barrieren eingedämmtes Öl mit Inipol EAP 22 behandelt wurde ³⁹. In allen Studien zeigte sich, dass dieser oleiphile Dünger nicht ausreichend hohe Mengen an Nährstoffen freisetzte und daher den natürlichen Abbau des Öls nur geringfügig steigerte. Bioremediationsmethoden, die also präventiv bereits auf hoher See eingesetzt werden können, um Ölverschmutzungen zu bekämpfen,

bevor diese die Strände erreicht haben, stellen nicht nur ein Marktlücke sondern auch eine der großen Herausforderungen dieses Bereiches der Biotechnologie dar.

Bioaugmentation

Eine weitere Herausforderung bietet die Bioaugmentation, die Zugabe von Mikroorganismen in verschmutzte Bereiche zur Beschleunigung des biologischen Abbaus der Schadstoffe. Bereits während der Feldversuche nach der Havarie der „Exxon Valdez“ wurden die Möglichkeiten einer Zugabe von solchen speziell angezüchteten Mikroorganismen erwogen und wieder verworfen ⁴¹. Obwohl verschiedenste Anbieter Rein- oder Mischkulturen verschiedenster Mikroorganismen in gefriergetrockneter Form anbieten, deren genaue Identität oder Zusammensetzung in der Regel ein Betriebsgeheimnis ist, konnte sich bislang keines dieser Produkte auf dem Markt durchsetzen oder in einer realen Ölverschmutzung mit Erfolg eingesetzt werden. In der Tat unterliegen solche Bakterienkulturen erheblichen Auflagen: So dürfen die verwendeten Mikroorganismen nicht pathogen sein, keine Toxine produzieren, genetisch stabil sein und müssen den häufig verwendeten Prozess der Gefriertrocknung überstehen können. Diese etablierte Lagerungsmethode bietet auch erhebliche Nachteile: So überlebt nur ein Teil der konservierten Mikroorganismen diese Prozedur. Nach der Zugabe gefriergetrockneter Bakterien in frisches Medium benötigen diese ausserdem einige Zeit, um wieder aktiv werden zu können. Ein anderes Problem betrifft die Art der Zugabe solcher Kulturen: Analog zu den anorganischen Düngern werden gefriergetrocknete Bakterien als Pulver geliefert. Werden diese auf eine Ölverschmutzung oder ins Meerwasser gegeben, so tritt wie im Falle der Dünger eine Ausschwemmung ein. Daher wurden solche Bioaugmentationsversuche bislang ausschließlich an Stränden oder in Böden durchgeführt.

Der Einsatz im Meer oder im Süßwasser erfordert eine Immobilisierung oder Bindung der Bakterien an ein Substrat, welches entweder am Öl haftet oder im Meer nicht weggespült wird. Neben diesen technischen Problemen stellt sich bei der Bioaugmentation ebenfalls die Frage, welche Organismen für die Bioremediation eingesetzt werden können. Einige Studien haben gezeigt, dass der Erfolg von Bioaugmentation in erheblichem Masse von den verwendeten Mikroorganismen abhängt ⁴⁷.

Um solche besonders geeigneten Organismen zu finden wurden Studien mit zwei unterschiedlichen Ansätzen verwendet: zum einen wurden Untersuchungen mit Kultivierungs- und kulturunabhängigen Methoden an Orten durchgeführt, die durch Havarien mit Öl verschmutzt wurden. Hierbei wurden Organismen gesucht, die infolge der Ölverschmutzung unter natürlichen Bedingungen ein besonders starkes Wachstum durchmachen und somit möglicherweise eine wichtige Rolle beim Abbau des Öls spielen ^{48, 49, 50, 51}. Parallel dazu wurden Proben aus chronisch oder durch einen Unfall bedingt verschmutzten Habitaten entnommen und durch Anreicherung in mit Öl behandelten Mikro- oder Mesokosmen Bakterien gezüchtet, die starke Abbundanzen und besondere Fähigkeiten beim Abbau des Öls in diesen Laborversuchen zeigten. Diese Versuche führten zur Entdeckung einer ganzen Gruppe von hervorragend an den marinen Ölabbau angepassten und spezialisierten Mikroorganismen, den marinen hydrocarbonoclastischen Bakterien (HCB).

1.7 Hydrocarbonoclastische Bakterien und obligate kohlenwasserstoffabbauende Mikroorganismen

Obwohl bereits seit 90 Jahren Forschung zum Thema ölabbauende Bakterien betrieben wurden, sind entscheidende Durchbrüche auf diesem Gebiet erst in den letzten zehn Jahren erreicht worden. Ein Grund dafür ist die Entwicklung molekularbiologischer Methoden, die unabhängig von der Kultivierung von Bakterien sind. Da nur ein sehr geringer Teil aller Bakterien kultivierbar ist und darüber hinaus auch in der Natur in den meisten Fällen mehrere Organismen an der Verwertung eines Substrates beteiligt sind, blieben die meisten am Ölabbau beteiligten Organismen bis in die 1990er Jahre unentdeckt. Mit dem Einzug von auf der Analyse der DNA und RNA basierenden Methoden wie Klon-Bibliotheken, DNA-Fingerprinting-Analysen sowie der Fluoreszenz in situ - Hybridisierung konnten nicht nur Mikroorganismen einwandfrei identifiziert werden und aktive Bakterien in Wasser- oder Bodenproben direkt analysiert werden. Ferner boten diese neuen Methoden eine hohe Auflösung was die Untersuchung von Mischkulturen anbelangt. Diese Methoden wurden hauptsächlich für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in ölverschmutzten Habitaten aber auch in Laborversuchen mit Mischkulturen angewandt. In der überwiegenden Mehrzahl aller Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Zahl an nachweisbaren Arten von Bakterien in Folge der Ölverschmutzung dramatisch abnimmt^{36, 50, 52, 53}. Dieser Prozess wird dabei noch unterstützt und verstärkt, wenn den untersuchten Flächen Nährstoffe zugegeben wurden.

Durch Anreicherung solcher besonders konkurrenzfähigen Bakterien in Mikrokosmen konnten einige dieser herausragenden Organismen isoliert und identifiziert werden. Eines der ersten in einer langen Reihe von herausragenden ölabbauenden Bakterien war das in der Nordsee isolierte Bakterium *Alcanivorax borkumensis*⁵⁴. Wie eine Analyse des Genoms dieses Organismus zeigte, zeichnet sich *A. borkumensis* durch eine ganze Reihe von Anpassungen an den Abbau von Öl und Kohlenwasserstoffen aus⁵⁵.

Neben der Produktion von membranständigen Glukolipiden, die als Biotenside wirken⁵⁶, verfügt dieses Bakterium über die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf Ölen sowie über Transporter-Proteine, die eine sehr hohe Affinität zu Nährstoffen wie Nitrat und Phosphat haben. Die bemerkenswerte Anpassung dieses Organismus ist jedoch ein Stoffwechsel, der optimal auf die Verwertung von Kohlenwasserstoffen angepasst ist. So verfügt *A. borkumensis* über zwei membranständige Alkanhydroxylasen, die eine Oxidation der Kohlenwasserstoffe durchführen können, ohne dass diese ins Cytoplasma eingeschleust werden müssen sowie drei Cytochrom P450 - Systeme^{34, 55}. Speziell die für Alkanhydroxylasen codierenden *alk*-Gene sind nahe des Replikationsursprungs des Chromosoms von *A. borkumensis* angeordnet, wodurch diese in großen Mengen exprimiert werden. Im Rahmen der funktionellen Genomanalyse dieses Bakteriums wurde darüber hinaus gezeigt, dass diese Oxygenasen nicht nur eine gewisse Redundanz verleihen, sondern in Abhängigkeit von den vorhandenen Substraten aktiv werden: so wurde beim Wachstum auf dem verzigten Kohlenwasserstoff Pristan beispielsweise eine hohe Aktivität von Cytochrom P450 beobachtet, während beim Wachstum auf Alkanen Alkanhydroxylasen exprimiert werden⁵⁵.

Der Metabolismus von *A. borkumensis* ist vollständig reduziert auf die Verwertung von Kohlenwasserstoffen: So liegen neben den unbedingt für den Abbau von Kohlenwasserstoffen nötigen Oxidasen und Hydroxylasen lediglich die Enzyme für den β -Oxidation von Carbonsäuren sowie der Citrat-Zyklus zum Abbau von Acetyl-Coenzym A, dem Endprodukt der β -Oxidation vor. Diese

extreme Spezialisierung bedeutet gleichzeitig eine hohe Effizienz beim Abbau der Kohlenwasserstoffe, da keine Energie für die Produktion anderer Enzyme benötigt wird. Da es allerdings gleichzeitig die ökologische Nische dieses Organismus stark einschränkt, ist dieses Bakterium auf eine permanente minimale Versorgung mit Kohlenwasserstoffen im Meer angewiesen, die jedoch möglicherweise aus biogenen Quellen hervorgehen ¹⁶.

Bereits erste Untersuchungen dieses Organismus haben gezeigt, dass dieses Bakterium die Eigenschaft besitzt, Grenzflächen zwischen Wasser und Öl zu besiedeln. Hierfür werden offensichtlich sowohl die membranständigen Biotenside als auch die Biofilmbildung eingesetzt. Grenzflächen stellen besondere Herausforderungen an Lebewesen, da zum Teil enorme physikalische Kräfte auf die einzelnen Zellen wirken. Eine Besiedlung dieses Habitat bietet diesem Organismus jedoch gleichzeitig eine sehr exklusive Nische.

Diese Vielzahl von Besonderheiten machen *A. borkumensis* zu einem extrem anpassungsfähigen Organismus, der sich auch in situ bei Ölunfällen nachweisen lässt. So wurde *Alcanivorax borkumensis* unter anderem im Falle der Tankerhavarie der „Nakhodka“ vor der japanischen Küste ⁵³, in verschmutzten Hafensedimenten ⁵⁰, an ölverschmutzten Stränden in Spanien nach dem Untergang der „Prestige“ ¹⁸ und vielen weiteren mit Öl kontaminierten Bereichen nachgewiesen, was andeutet, dass dieses Bakterium ubiquitär in den Weltmeeren vorhanden ist ⁵⁸. Neben *A. borkumensis* wurden auch zwei Schwesterarten, *Alcanivorax venustensis* und *Alcanivorax dieselolei* isoliert, welche dieselben Eigenschaften und Konkurrenzfähigkeit aufweisen ^{59, 60}. Die besondere Bedeutung dieses Organismus für den Ölabbau konnte in einer Studie gezeigt werden, in der Ölverschmutzungen mit einer niedrigen Konzentration an Nährstoffen bzw. mit hohen Konzentrationen, wie sie im Falle eines Bioremediationsversuches eingesetzt werden, behandelt wurden. In beiden Fällen wurden Blüten von *A. borkumensis* nachgewiesen, wobei jedoch zwei unterschiedliche Stämme dieses Bakteriums auftraten. Dies zeigt, dass dieser Organismus nicht nur unter normalen Umweltbedingungen eine Rolle bei Ölabbau spielt, sondern sich auch bei einem großen Nährstoffangebot gegenüber Konkurrenten durchsetzen kann ²⁷.

Neben dieser genetischen Variabilität in Bezug auf Nährstoffe zeigt *A. borkumensis* auch ein äusserst interessantes Substratspektrum: Obwohl dieser Mikroorganismus in seiner Nahrung auf Kohlenwasserstoffe begrenzt ist, liegt doch innerhalb dieser Stoffklasse ein relativ breites Spektrum verwertbarer Substanzen vor: Während in den ersten Publikationen noch festgestellt wurde, dass *A. borkumensis* besonders gut Alkane und lineare aliphatische, sowie verzweigte Kohlenwasserstoffe wie Phytan und Pristan ⁵⁴. Obwohl dieser Organismus scheinbar über keine Fähigkeiten zum Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe verfügt, konnte gezeigt werden, dass die Seitenketten von n-Alkylcycloalkane und n-Alkylbenzole verwertet werden können ⁶¹. In der Folge der Entdeckung von *Alcanivorax borkumensis* wurden noch 19 weitere dieser obligaten ölabbauenden Mikroorganismen (Obligate Hydrocarbonoclastic Bacteria – OHCB) entdeckt, isoliert und identifiziert. Alle Mitglieder zeigen bei der Überprüfung der Stoffwechseleigenschaften mittels BIOLOG-Platten nur die Verwertung von zweien der 95 Substrate, den Tensiden Tween 20 und Tween 80. Beide Stoffe enthalten lange Alkylreste, die durch ihre Homologie zu den n-Alkanen in das Substratspektrum dieser Bakterien fallen ⁵⁸.

Neben *Alcanivorax borkumensis* konnten so auch die Mikroorganismen *Thalassolituus oleivorans*, *Oleiphilus messinensis*, *Oleispira antarctica* und *Cycloclasticus pugettii* als obligate

Kohlenwasserstoffabbauer identifiziert werden⁶²⁻⁶⁵. Abb. 1.7 zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gruppe dieser obligaten Ölabbauer⁵⁸.

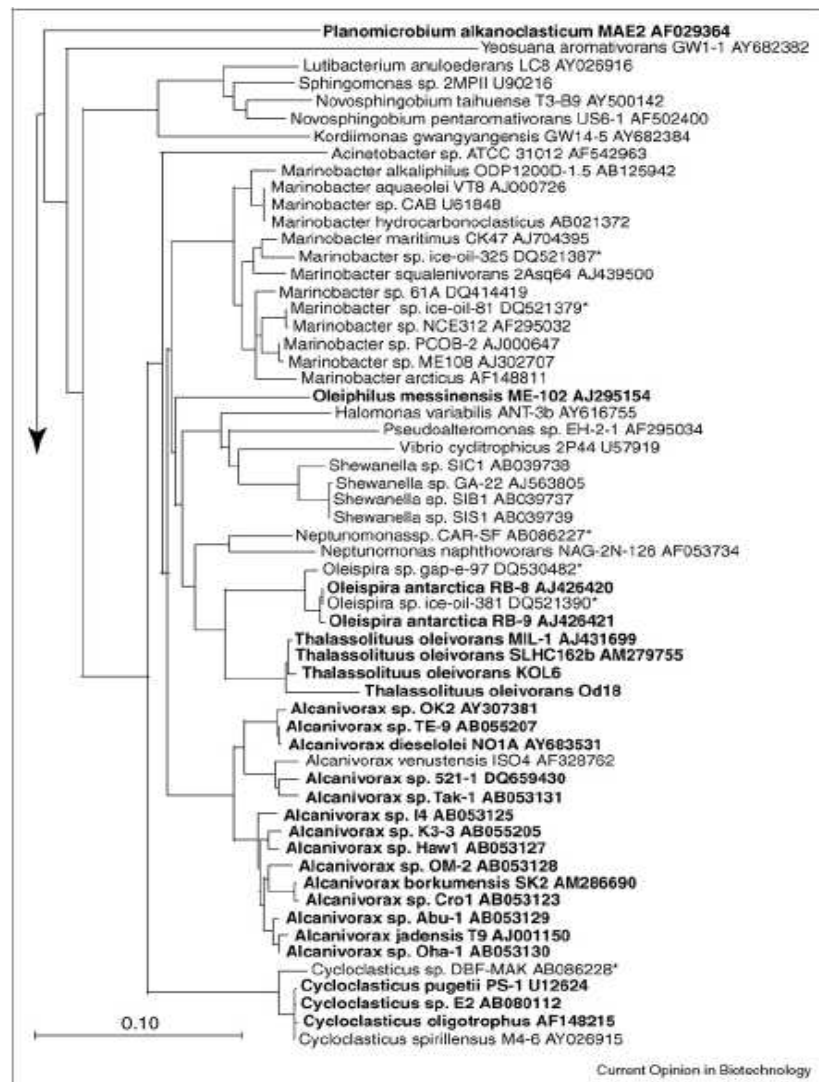


Abb. 1.7: Phylogenetische Verwandtschaft der marinen ölabbauenden Bakterien. Die Namen der obligaten Ölabbauer sind fett gedruckt. Mit Sternen markierte Organismen liegen bislang nicht als Reinkultur vor. Nach Yakimov et al., 2007⁵⁸.

Wie aus dem phylogenetischen Baum hervorgeht, fallen die meisten der obligaten ölabbauenden Bakterien in die Gruppe der Gammaproteobakterien. Nur *Planomicrobium alkanoclasticum* gehört zur Cytophaga-Flavobacterium-Gruppe⁵⁸.

Obwohl alle diese Organismen bereits durch die ausschliessliche Verwertung von Kohlenwasserstoffen hochspezialisiert sind, gibt es innerhalb der Gruppe der OHCB noch weitere Begrenzungen des Substratspektrums sowie der globalen Verbreitung. So verfügt *Oleispira antarctica* zwar über ein sehr ähnliches Substratspektrum wie *A. borkumensis*, wurde bislang aber nur in polaren, kalten Meeren angetroffen⁵⁸. Es verfügt im Gegensatz zu *Alcanivorax borkumensis* hohe Konzentrationen von Chaperonine, die die Enzymaktivität dieses Organismus bei niedrigen Temperaturen stark verbessern¹⁴⁶. Andere Organismen coexistieren mit *A. borkumensis* in einem

Habitat und stellen ähnliche Bedingungen an ihre Umgebung, verwerten jedoch eine völlig andere Fraktion der Kohlenwasserstoffe, wie beispielsweise *Cycloclasticus pugettii*, der häufig ebenso wie *A. borkumensis* bei Ölverschmutzungen im Meer nachgewiesen wird, wobei jedoch meist eine zeitliche Differenz zwischen den Blüten beider Mikroorganismen auftritt^{50, 51}.

Dieser hohe Grad an Spezialisierung ist ein gutes Beispiel für das Konkurrenzausschlussprinzip, nach dem zwei Organismen niemals exakt dieselbe ökologische Nische teilen können. Jedoch stellt eine Ölverschmutzung diese spezialisierten und höchst effizienten Bakterien vor eine besonders schwierige Aufgabe: sie werden je nach der Art des Öls mit einer komplexen Mischung aus hunderten bis tausenden von einzelnen Substanzen konfrontiert⁶⁶.

1.8 Mikrobielle Gemeinschaften und ölabbauende Konsortien

Obligate hydrocarbonoclastische Bakterien sind extrem gut an ihr Substrat angepasst und gegenüber der natürlichen Mikroflora im Vorteil, sobald Öl ins Meer gelangt. So wurden im Falle von Ölverschmutzungen^{51, 53} beobachtet, dass 90% der Zellen in ölverschmutzten Stränden auf diese Bakterien entfallen. In einigen Fällen wurde sogar eine gewisse Sukzession beobachtet, in der zunächst eine Blüte von *A. borkumensis* gefolgt von einer Blüte von *Cycloclasticus pugettii* auftrat⁵⁰. Diese Abfolge wurde offensichtlich bedingt durch die schnellere Verwertung leichter abbaubarer n-Alkane durch *Alcanivorax borkumensis* in Kombination mit seiner ausserordentlich guten Aufnahme von Nährstoffen. Eine Reihe weiterer Studien zeigte ebenfalls ein solches paralleles Auftreten mehrerer obligater Ölabbauer: So konnten Yakimov et al. in Mikrokosmenstudien von ölverschmutztem Hafensediment zeigen, dass in der Tat mehrere dieser Organismen in den Proben vorhanden waren und offensichtlich unterschiedliche Substrate verwerteten: So wurde durch Zugabe von Tetradekan das Wachstum von *Thalassolituus oleivorans* angeregt, eine Zugabe von Naphtalen führte zur Anreicherung von *Neptunomonas* sp.⁵⁰. Erstaunlicherweise konnte nach der Verwendung von Rohöl als Substrat eine Blüte von *A. borkumensis* beobachtet werden. Ein vergleichbares Experiment von McKew et al. mit Sediment aus einer Salzmarsch nahe einer Raffinerie, das mit verschiedenen Kohlenwasserstoffen behandelt wurde, zeigte ein Wachstum von *A. borkumensis*, *T. oleivorans* und *Cycloclasticus pugettii*.

Somit waren in dieser Probe mindestens drei obligate Kohlenwasserstoffabbauer aktiv, die jedoch unterschiedliche Substrate verwerteten. Erstaunlicherweise wurde ein Wachstum von *A. borkumensis* nur auf verzweigten Kohlenwasserstoffen, nicht jedoch auf n-Alkanen, welche von *T.oleivorans* und einer Art der Gattung *Roseobacter* verwertet wurden²⁶.

Solche Beobachtungen wurden in der Tat einer Vielzahl von Studien gemacht^{37, 50, 52} und zeigen, dass trotz der zahlenmässigen Dominanz und der scheinbaren Reduzierung der Diversität nach der Kontamination mit Öl dennoch eine erhebliche Zahl an verschiedenen, weniger gut an den Ölabbau angepassten Mikroorganismen in solchen Systemen vorliegen. Obwohl insbesondere die relativ kleinen Mikrokosmenansätze, die für viele dieser Versuche verwendet wurden, ein künstliches System darstellen, dass viele Interaktionen der Mikroorganismen mit der Umwelt nicht berücksichtigt, konnten diese Beobachtungen auch in Feldversuchen bestätigt werden: So konnten durch Gerdes et al. gezeigt werden, dass eine Gemeinschaft ölabbauender Bakterien sich neben *Pseudomonas* spp. , *Shewanella* sp. und *Marinobacter* sp., welche die Fähigkeit zum Ölabbau zeigten, auch aus Spezies ohne diese Besonderheit, *Pseudoalteromonas* sp. und *Psychrobacter* sp., zusammensetzte⁶⁸. Analog

hierzu konnte durch Brakstadt et al. gezeigt werden, dass eine ölabbauende Gemeinschaft aus der nördlichen Nordsee zwar von dem Bakterium *Oleispira antarctica* dominiert wurde, jedoch ebenfalls Bakterien enthielt, die offensichtlich keine Rolle beim Ölabbau spielen ¹⁴.

Wie durch Yakimov et al. festgestellt, kommen durch die geringe Größe der Mikrokosmenstudien häufig die wahren physiologischen Eigenschaften einzelner Spezies nicht zur Geltung ⁵⁸. Ferner können durchaus verschiedene Stämme desselben Organismus unterschiedliche Substratspektren und Stoffwechseleigenschaften aufweisen, weshalb eine Analyse der 16S rRNA keine wirklichen Rückschlüsse auf die Rolle des einzelnen Organismus zulässt. Es liegt jedoch nahe, dass in Form eines Konkurrenzausschlusses mehrere obligate ölabbauende Bakterien kooperieren, da eine hohe Diversität mit einer hohen Funktionalität einer mikrobiellen Gemeinschaft korreliert ⁶⁹. Hierdurch entsteht eine gewisse Redundanz, so dass im Falle sich während des Ölabbaus verändernder Umweltbedingungen ein ölabbauendes Bakterium die Nische und Rolle eines anderen übernehmen kann. Ein solches Konsortium aus Bakterien hat durch seine höhere Flexibilität einen erheblichen Vorteil bei der Erschließung des Substrates Öl.

Ein weiterer Grund für die Diversität innerhalb von ölabbauenden Mikroorganismengemeinschaften bzw. Konsortien ist die Bildung verschiedener Nischen, die sich aus der Aktivität der eigentlichen Ölabbauer ergeben ²⁷. So wird zum Beispiel erst durch die Oberflächenvergrößerung in Folge dieser Aktivität die Bioverfügbarkeit des Öls erhöht und diese Ressource anderen Organismen, wie zum Beispiel *C. pugettii* zugänglich. Die Besiedlung der Grenzflächen zwischen Öl und Wasser in Verbindung mit einer Biofilmbildung, zum Beispiel durch *A. borkumensis* bietet ein Substrat, auf dem andere, weniger gut vor der hydrophoben Eigenschaften des Öls geschützten Mikroorganismen wachsen können. Sowohl Biotenside, Komponenten des Biofilms, Intermediate des Ölabbaus als auch Stoffwechselendprodukte bieten die Nahrungsgrundlage anderer Organismen. Die Verwertung dieser Stoffe führt wiederum zu einer Rückführung von Nährstoffen in das Ökosystem, was den weiteren Abbau des Öls fördert. Letztlich bietet sogar die Biomasse der ölabbauenden Bakterien eine Nahrung für andere Mikroorganismen. Diese sekundären aber dennoch wichtigen Faktoren im Zusammenhang mit dem natürlichen Abbau von Öl im Meer haben gezeigt, wie wichtig nicht nur die eigentlichen ölabbauenden, sondern alle potenziellen Mitglieder eines Konsortiums sein können.

1.9 Ziel dieser Studie

- Die Untersuchung der Verwendbarkeit eines neuartigen Ölbindemittels sowie des ölabbauenden Meeresbakteriums *A. borkumensis* für eine potenzielle Bioremediationsmethode. Hierbei sind weder mögliche Anwendungen noch Eigenschaften des Ölbindemittels während des Einsatzes im Salzwasser bekannt. Besonders entscheidende Faktoren wie Aufnahmekapazität und Schwimmfähigkeit von Ölbindemitteln müssen erst noch ermittelt werden. Der wichtigste Punkt ist jedoch die Interaktion von Ölbindemittel und Bakterien. Da physikalische und chemische Eigenschaften während und in der Folge des Einsatzes im Meerwasser unbekannt sind, stellt sich beispielsweise die Frage, ob durch vom Ölbindemittel freigesetzte Stoffe ölabbauende Bakterien geschädigt oder gefördert werden und ob ein Wachstum von Bakterien auf dem Ölbindemittel möglich ist.

- Untersuchung verschiedener Massnahmen wie Bioaugmentation und Biostimulation sowie des Einsatzes verschiedener Ölbindemittel in Kleinversuchen. Die erfolgreichste Kombination von Methoden soll darauf hin in Form eines Prototyps einer Ölbekämpfungsmethode in einem Großversuch getestet werden. Dabei wird besonderer Wert auf die Entfernung des Öls aus der Wassersäule und die Aktivität der Bakterien gelegt. Durch molekularbiologische Analyse des entstehenden Konsortiums sollen ferner einzelne Mitglieder dieser Gemeinschaft identifiziert werden.

- Analyse der Interaktionen der marinen Mikroorganismen infolge des biotechnologischen Eingriffs in den natürlichen Ölabbau. Da die hier verwendete Ölbekämpfungsmethode ein neuartiges Habitat mit bislang nicht untersuchten abiotischen und biotischen Faktoren darstellt und sich von terrestrischen Systemen unterscheidet, muss durch molekularbiologische Methoden die Ökologie des Ölabbaus unter den gewählten Versuchsbedingungen untersucht werden. Von besonderem Interesse ist vor allem der Einfluss von *A. borkumensis* auf die Gemeinschaft.

2 Material und Methoden

2.1 Mikrokosmenversuche zur Anwendung von Ölbindemitteln

Zur Untersuchung der Interaktion mikrobieller Gemeinschaften mit Ölbindemitteln und somit zur Überprüfung der Einsatzmöglichkeiten dieser wurden 50 Mikrokosmen von je 500 ml Gesamtvolumen etabliert. Dabei handelte es sich um 25 verschiedene Ansätze mit je zwei Parallelen. Mittels dieser 25 Ansätze sollten mehrere Kombinationsmöglichkeiten von Ölbindemitteln, Nährstofflösungen und Inokula getestet werden. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Mikrokosmen ist Tabelle 2.I zu entnehmen. Die Kernfragestellung dieser Versuchsreihe bezog sich dabei auf die Vereinbarkeit von Ölbindemitteln mit natürlichen und beeinflussten Bakterienkulturen sowie mit Reinkulturen von *A. borkumensis*. Im Folgenden wird auf die einzelnen Komponenten der Mikrokosmen eingegangen. Alle aufgeführten Mikrokosmen bestehen im Wesentlichen aus 500ml – Pyrex Glasflaschen (Pyrex, Frankreich). In die Flaschen wurden die folgenden Substanzen bzw. Medien gegeben:

Als Basismedium wurden entweder je 500 ml unsteriles, unfiltriertes Meerwasser (Probennahme am 28.7. 2004 im Nordosthafen zu Helgoland) oder 500 ml autoklaviertes Seewasser verwendet. Zwei Sorten von Bindemitteln, und zwar das Ölbindemittel X-Oil mit einer Körnungsgröße von 8 mm, hauptsächlich aus Leder bestehend (Hellmann-Tech, Lehrte, Deutschland) oder X-Oil mit einer Körnungsgröße von 8 mm, hauptsächlich aus Altschuh bestehend (Hellmann-Tech, Lehrte, Deutschland) dienten der Bindung von Schweröl in den Mikrokosmen.

Düngemittellösung nach Gunkel⁷⁰

75 ml dieser Düngemittellösung⁷⁰ wurden zu jeweils 375 ml autoklaviertem/unsterilem Meerwasser und 50 ml destillierten und autoklavierten Wassers gegeben. Diese Mischung behält die Salinität des Meerwassers bei, verhindert jedoch die Präzipitation der enthaltenen Salze. Die insgesamt 500 ml aller drei Lösungen ergeben einen Mikrokosmos.

Bunker C –Schweröl

Den Mikrokosmen wurde jeweils 2,5 ml (0,5% v/v) Bunker C – Schweröl, IFO 380, der Firma Shell, Tanklager Stade, zugegeben. Die Zahl 380 bezieht sich dabei auf die Viskosität von 380 Centistokes (mm²/s) bei 50°C. Das Öl wurde zuvor durch Erhitzen auf 130°C mittels einer Heizplatte sterilisiert und verflüssigt, um ein besseres Pipettieren des Öls zu ermöglichen. Bunker C-Öl wird wegen seiner hohen Viskosität bei der Verwendung in Schiffen in sogenannten „Booster“-Einheiten (Durchlauferhitzern) regulär auf 50 – 60°C, vor dem Einspritzen und Zünden sogar auf 130 – 140°C erhitzt, um eine optimale Verbrennung in den Schiffsmotoren zu ermöglichen und ein Verkleben von Treibstoffleitungen, Einspritzdüsen und Kolben zu verhindern⁶⁶.

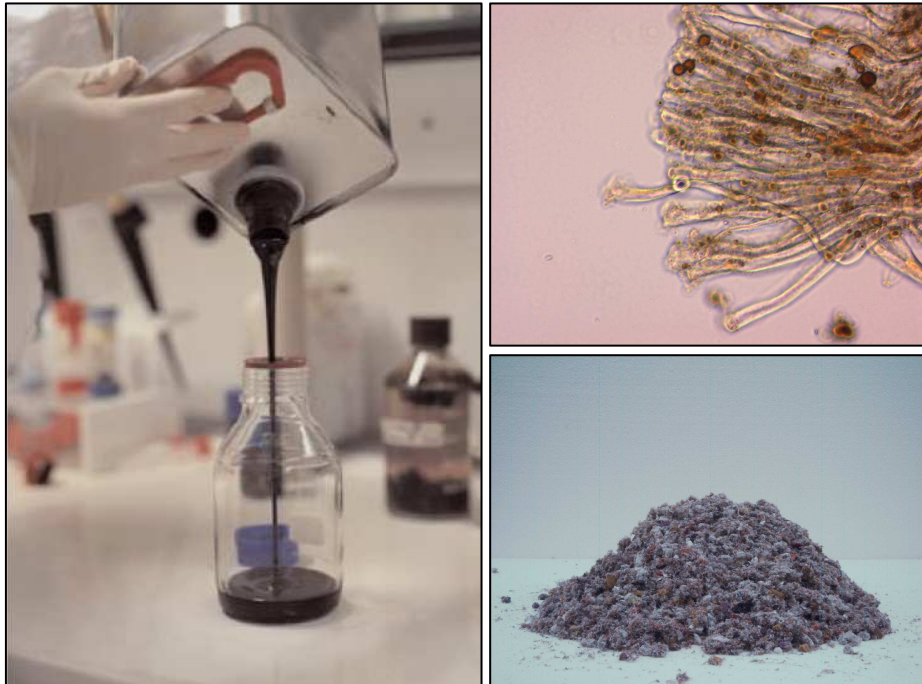


Abb. 2.1: links: Bunker C - Schweröl; rechts oben: Fasern von X-Oil mit gebundenem Schweröl, 100fache Vergrößerung; rechts unten: Ölbindemittel X-Oil

Mikrobielle Inokula

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurden bereits viele Versuche unternommen, bakterielle Gemeinschaften durch Zugabe von speziellen Laborkulturen zugunsten verstärkten Ölabbau zu verändern. Diese „Bioaugmentation“ basiert dabei auf der massiven Zugabe optimal angepasster Mikroben. In diesen Versuchsreihen wurden drei unterschiedliche Mikrobengemeinschaften verwendet:

- a) Eine Reinkultur von *Alcanivorax borkumensis* SK2 (DSM 11573, DSMZ, Braunschweig); Koloniematerial von *A. borkumensis* wurde von einer Platte ONR7-Agars mit 20% Natriumpyruvat entnommen, in sterilem ONR7-Medium resuspendiert und in einer Endkonzentration von 1×10^5 Zellen pro ml zu autoklaviertem Meerwasser gegeben
- b) Meerwasser; eine Probe von Meerwasser wurde am 28.07.2004 oberflächennah im Nordosthafen der Insel Helgoland entnommen. Das unfiltrierte Wasser wurde unmittelbar für die Mikrokosmen eingesetzt
- c) Augmentiertes Meerwasser: 1×10^5 Zellen von *A. borkumensis* wurden wie oben beschrieben zu unsterilem Meerwasser gegeben.

Die Mikrokosmen wurden bei einer konstanten Temperatur von 17°C auf einem Schüttler bei 90 rpm für einen Zeitraum von 42 Tagen inkubiert. Es wurden wöchentlich Proben von je 250 ml entnommen. Das dadurch fehlende Flüssigkeitsvolumen wurde durch autoklaviertes Meerwasser, bzw. autoklaviertes Meerwasser, welches mit der Düngemittellösung nach Gunkel behandelt wurde, ersetzt.

150 ml der Mikrokosmenflüssigkeit wurden mittels eines Bottle-Top-Filters mit einem 0,2 µm-Nitrocellulose-Filters (Sartorius, Göttingen) filtriert. Die DNA der Biomasse auf den Filtern wurde mittels der weiter unten beschriebenen Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert.

100 ml der Mikrokosmenflüssigkeit wurden für mikroskopische Zwecke verwendet bzw. für die unten beschriebene DNA-Quantifizierung mittels PicoGreen eingefroren und aufbewahrt. Für Zellzählungen von Prokaryonten und Eukaryonten wurden Aliquots von je 50 ml Paraformaldehyd (PFA) in einer Endkonzentration von 1% (w/v) zugegeben und die so konservierten Proben bei 4°C gelagert.

Parallel zu den Probennahmen wurden mittels eines OxyScan Graphic (UMS, Meinersen) – Sauerstoffmessgeräts die Sauerstoffkonzentrationen in den einzelnen Mikrokosmen bestimmt. Ferner wurden Proben von mit Öl kontaminiertem X-Oil-Ölbindemittel entnommen und wie weiter unten beschrieben extrahiert.

Tab. 2.I: Zusammensetzung der unter 2.1.1 beschriebenen Mikrokosmen. Die Zusammensetzung wurde für beide Parallelen jedes Mikrokosmos übernommen. Die einzelnen zugesetzten Komponenten und die Durchführung sind oben beschrieben

Mikrokosmos Nr.	<i>A.borkumensis</i>	steriles Meerwasser	unsteriles Meerwasser	Bunker C	X-Oil (Leder)	X-Oil (Schuh)	Nährstoffe
1	-	+	-	+	-	-	-
2	+	+	-	+	-	-	-
3	+	+	-	+	-	-	+
4	+	+	-	+	+	-	-
5	+	+	-	+	+	-	+
6	+	+	-	+	-	+	-
7	+	+	-	+	-	+	+
8	-	-	+	-	-	-	-
9	-	-	+	-	-	-	+
10	-	-	+	-	+	-	-
11	-	-	+	-	+	-	+
12	-	-	+	-	-	+	-
13	-	-	+	-	-	+	+
14	-	-	+	+	-	-	-
15	-	-	+	+	-	-	+
16	-	-	+	+	+	-	-
17	-	-	+	+	+	-	+
18	-	-	+	+	-	+	-
19	-	-	+	+	-	+	+
20	+	-	+	+	-	-	-
21	+	-	+	+	-	-	+
22	+	-	+	+	+	-	-
23	+	-	+	+	+	-	+
24	+	-	+	+	-	+	-
25	+	-	+	+	-	+	+

2.2 Mesokosmenversuche zur Anwendbarkeit biotechnologischer Reinigungsverfahren mittels biologischen Ölabbau

Wie bereits erwähnt werden seit der Havarie des Öltankers „Exxon Valdez“ im Jahre 1991 Versuche unternommen, marine Ölabbauethoden mittels ölabbauender Bakterien zu etablieren. Bis dato sind jedoch keine marktreifen Produkte aus sowohl industrieller als auch institutioneller Forschung hervorgegangen. Kernprobleme dieser Produkte sind dabei die Verwendung von adäquaten Düngemitteln sowie Bakterienkulturen.

Im Falle der „Exxon Valdez“-Havarie wurden neben Inipol EAP 22 auch große Mengen von flüssigen Düngemittellösungen sowie Bakterienkulturen angewandt^{40, 41}. Dies hat – neben anderen, weiter oben genannten Gründen - offensichtlich den Nachteil, dass beide Lösungen im flüssigen Medium Meerwasser verdünnt werden und somit wirkungslos werden.

Verwendete Düngemittel (Biostimulation)

Ein interessanter Lösungsansatz dieses Problems wurde von Xu und Obard im Jahr 2004 veröffentlicht⁴⁶. Bei dem experimentellen Versuch ölverschmutzte Strände in Form von Mesokosmen mittels Bioremediation zu reinigen wurden Langzeitdünger eingesetzt. Diese so genannten „Slow-release fertilizers“ sind ein gängiges Mittel im Pflanzenbau und werden als industrielles Massenprodukt hergestellt sowie vertrieben. Im Wesentlichen handelt es sich um mit variablen Salzmischungen gefüllte Kugeln von ca. 2 – 3 mm Durchmesser, die von einer speziellen Membran umschlossen werden. Bei Kontakt mit Feuchtigkeit quellen die Membranen auf und werden osmotisch aktiv. Dabei werden nach und nach die enthaltenen Nährstoffe freigesetzt. Je nach Anforderungen sind verschiedene Nährstoffabgaberraten (release rates), Abgabezeiträume (zwischen 2 und 6 Monaten) sowie unterschiedlich geregelte Abgaberraten (linear, logarithmisch) verfügbar.

Für die folgenden Versuche wurde in Abweichung zu Xu et al. der Langzeitdünger Osmocote Pro 18+10+11+2MgO+TE der Firma Scotts verwendet. Die genauen Inhaltstoffe sind in unten aufgeführt. Für den aufgeführten Versuch wurde zunächst versucht, eine optimale pro Ölvolumen zu bestimmte Düngermenge zu bestimmen. Dies wurde in Mikrokosmen im 1:1000 Massstab (500 ml) durchgeführt. Es zeigte sich, dass ein Verhältnis von Öl zu Dünger von mindestens 2:1 nötig war, um eine Emulsionsbildung innerhalb von 4 Wochen einzuleiten.

Zusammensetzung Osmocote Pro® 18 + 10 + 11 + 2MgO + TE in Gewichtsprozent nach Herstellerangaben

18% Stickstoffhaltige Verbindungen (w/w)

⇒ 9% NO_3^- / 8% NH_4^+ / 1% Harnstoff

10% Phosphorhaltige Verbindungen

⇒ u.a. 8% P_2O_5 = 3% (w/w) Phosphor

11% K_2O

⇒ 9,2% (w/w) Kalium

2% MgO

⇒ 1,2% (w/w) Magnesium

Spurenelemente (TE):

0,009% Bor

0,24% Kupfer

0,2% Eisen

0,03% Mangan

0,008% Molybdän

0,008% Zink

Verwendete Ölbindemittel und Hüllmaterialien

In Übereinstimmung mit den Mikrokosmenversuchen wurde das Ölbindemittel X-Oil (Hellmann-Tech, Lehrte) für die Mesokosmenversuche verwendet. In diesem Fall wurde X-Oil, welches aus Altschuh-Resten produziert wird, verwendet. Dabei wurde eine 1:1 Mischung aus Granulat der Körnungsgrößen 0,3 mm und 0,8 mm angewandt. Vor der Verwendung wurde das Ölbindemittelgranulat in einer Plastikkiste geschüttelt und gesiebt, um feste Bestandteile (zum Beispiel Reststücke von Schuhsohlen oder Metallösen), die nicht zur Bindung des Öls beitragen, aber die Schwimmfähigkeit beeinträchtigen, abzutrennen. Zur Anwendung kam somit nur der faserige Anteil dieses Ölbindemittels.

Da X-Oil im Falle von Erhitzung feuergefährlich sein kann und durch Sterilisation mit Dampf oder Hitze seine Eigenschaften verändert, ferner eine Sterilisation des Ölbindemittels im späteren industriellen Masstab impraktikabel ist, musste auf eine solche im Versuchsablauf verzichtet werden.

Als Hüllmaterial wurde ein dreilagiges Polypropylen-Gewebe (Hellmann-Tech, Lehrte) mit einer Porengröße von 5 µm verwendet. Es ist vollkommen inert und hat eine hohe Durchlässigkeit für verschiedene Öle. Da dieses denselben Beschränkungen unterliegt wie das X-Oil wurde auch das Hüllmaterial nicht sterilisiert.

Verwendetes Inokulum (Bioaugmentation)

Analog zu den Düngemitteln können auch mikrobielle Inokula im Meer ausgeschwemmt werden. Der Lösungsansatz dieses Problems ist daher analog zum demjenigen der Düngemittel. Ein Inokulum von *A. borkumensis* wurde auf der Oberfläche von ölkontaminiertem Ölbindemittel gezüchtet.

300 g X-Oil Ölbindemittel wurden in 1 l 70% Ethanol über Nacht inkubiert und danach in sterilen Petrischalen getrocknet. Zu den 250 g Ölbindemittel wurden 50 ml auf 100°C erhitztes Bunker C-Öl (IFO 380, Shell, Hamburg) und das so behandelte Bindemittel in einen sterilen Behälter mit sterilem ONR7 – Flüssigmedium gegeben. In diesen Behälter wurde Biomasse von *Alcanivorax borkumensis* SK2 in einer Endkonzentration von 1×10^5 Zellen pro ml Medium gegeben. Das Becken wurde mittels Pressluft belüftet und durchmischt. Eine Kontamination wurde durch sterilisierte Schläuche und einen vorgelagerten 0,2µm-Filter (Sartorius, Göttingen) vermieden. Das Ölbindemittel wurde 14 Tage im Becken bei 20°C inkubiert und dabei sowohl die Emulsions- als auch die Biofilmbildung durch *A. borkumensis* mikroskopisch untersucht. Das durch *A. borkumensis* bewachsene Ölbindemittel wurde entnommen, in eine mit 70%igem Ethanol sterilisierte Plastikflasche gefüllt und in einer Kühlbox bei circa 4°C an die Biologische Anstalt Helgoland verschickt. Die Zellzahl von *Alcanivorax borkumensis* pro g Ölbindemittel wurde mikroskopisch mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Verwendetes Öl

Für sämtliche Versuche wurde eine von der Firma Shell (Hamburg) zur Verfügung gestellte Probe Bunker C-Schweröl IFO 380 zur Verfügung gestellt. Es wurden vom Hersteller keine genaueren Angaben zu Herkunft, Ausgangsmaterial oder Bestandteilen gemacht. Nach persönlicher Kommunikation mit Dr. Michail M. Yakimov vom Istituto Sperimentale Talassografico, Messina, Italien wurden dem Bunker C-Schweröl das biologisch sehr schwer abbaubare Squalen ($C_{30}H_{50}$, 2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaen) in einem Verhältnis von 1:4000

zugesetzt. Diese Markersubstanz dient als Indikator für die Extraktionseffizienz und als interner Standard für spätere gaschromatographische Analysen.

Aufbau einer ölbindenden Schwimmbarriere

Aus den oben genannten Bestandteilen wurde eine drehrunde Schwimmbarriere von ca. 200 cm Länge und 18 cm Durchmesser konstruiert. Das Gesamtvolumen der Barriere betrug somit circa 38 l. Hierzu wurde eine 200 cm langes und 20 cm breites Stück Hüllstoff zu einer sackartigen Struktur vernäht und mit 10 kg X-Oil Ölbindemittel, die sich wie oben beschrieben zusammensetzten, befüllt. Unter das Ölbindemittel wurden zuvor 4 kg Osmocote-Dünger gemischt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung von Beginn des Versuches an zu gewährleisten. Um den Auftrieb der Barriere zu verstärken wurden 10 leere Plastikflaschen zu je 250 ml (Kautex, Bonn) gleichmässig in der Schwimmbarriere verteilt. Die Barriere wurde darauf vernäht, wobei vier Öffnungen zur späteren Zugabe des Inokulums sowie zur Probennahme geöffnet blieben und nur provisorisch mit Plastikklemmen verschlossen wurden. Das Gesamtgewicht der Schwimmbarriere betrug circa 16 kg was eine theoretische Aufnahmekapazität von 50 l Öl ermöglichte.

In die Schwimmbarriere wurden mittels der vier Öffnungen 300g des Inokulums gleichmässig verteilt, nachdem diese im späteren Versuchsbecken platziert wurde.

Aufbau einer ölbindenden Schwimmmatte

Analog zu einer Schwimmbarriere wurde eine auf der Wasseroberfläche schwimmende Matte aus denselben Materialien konstruiert. Da diese für eine spätere Phase des Versuchs verwendet werden sollte, in der nur noch wenig Öl vorliegt, die Bakteriengemeinschaften jedoch schon in hoher Anzahl vorhanden waren, wurde in diesem Fall kein Inokulum zugefügt.

Ein 120 cm langes und 70 cm breites Stück des Hüllstoffes wurde zunächst zu einem Sack von 60 x 70 cm vernäht und dieser mit 4 kg X-Oil befüllt, unter die zuvor 1,5 kg Osmocote-Dünger gemischt wurden. Um die Schwimmfähigkeit der Matte zu verbessern, wurden 9 Plastikflaschen von je 250 ml (Kautex, Bonn) zugefügt. Darüber hinaus wurde die Matte durch je zwei Nähte in Längs- und Querrichtung in 9 gleichgroße Felder aufgeteilt. Der Inhalt der Matte wurde vor dem Vernähen gleichmässig verteilt, so dass pro Feld eine Plastikflasche und eine ungefähr gleiche Menge Ölbindemittel und Dünger vorhanden war.

Versuchsdurchführung

Aufgrund der Umweltschutzbestimmungen der Insel Helgoland ist eine Entsorgung flüssiger Abwässer, die Meerwasser enthalten, durch die kommunale Kläranlage verboten. Eine Entsorgung von ungeklärten Abwässern in die umgebende Nordsee oder Verklappung auf See ist wegen des Status als Naturschutzgebiet untersagt. Der im Folgenden beschriebene Versuch ist daher auf eine Abwasserminimierung bei gleichzeitigem optimalen Ölabbau ausgelegt. Für die Versuche wurden drei Bassins aus Polyvinylchlorid (Hellmann-Tech, Lehrte) von 80 cm Breite, 90 cm Höhe und 110 cm Länge und somit einem Fassungsvermögen von 0,792 m³ verwendet. Eines der Bassins wurde am 17. 07. 2006 mit 500 l unbehandeltem Meerwasser aus einer Saugleitung der Biologischen Anstalt Helgoland befüllt. Das Becken wurde mittels Pressluft, die durch mehrere poröse Aquarien-Belüftungssteine geleitet wurde, belüftet und durchmischt.

Der umgebende Raum wurde über die gesamte Versuchsdauer konstant auf einer Temperatur von 18°C gehalten. Dies entsprach der Wassertemperatur der Nordsee bei Helgoland am Tag der Befüllung des Beckens.

In dieses Mesokosmenbecken (Mesokosmos I) wurde die oben beschriebene Schwimmbarriere platziert und mittels eines Drahtes zu einer kreisförmigen Barriere geschlossen. Wie bereits beschrieben wurde das Inokulum aus Ölbindemittel und Biofilm von *A. borkumensis* gleichmässig in der Schwimmbarriere verteilt. Abschliessend wurden 2,5 l Bunker C-Schweröl (IFO 380, Shell, Hamburg) in einem Glasgefäss abgemessen und mittels eines Wasserbades auf circa 100°C erhitzt. Das verflüssigte Schweröl wurde zu etwa einem Drittel auf die Barriere und zu zwei Dritteln in die Wassersäule gegeben.

Dem Mesokosmos I wurden anhand des Probenschemas in Tabelle 2.II Flüssigkeit für verschiedene Untersuchungen entnommen. Die Temperatur sowie die Sauerstoffkonzentrationen wurden täglich bzw. in Abständen von zwei Tagen mittels eines OxyScan Graphic Sauerstoffmessgerätes (UMS, Meinersen) gemessen. Ebenso wurde täglich bzw. zweitäglich die Sauerstoffkonzentration innerhalb der Schwimmbarriere durch eine der Öffnungen bestimmt.

Parallel zu den Sauerstoffmessungen wurden je 10 ml Mesokosmenflüssigkeit entnommen und unter dem Lichtmikroskop betrachtet, wobei insbesondere auf mikrobielles Wachstum und Emulsionsbildung geachtet wurde.

Tab. 2.II: Probennahmeschema für das Mesokosmenbecken I

Datum	Versuchstag	DNA	RNA	Sauerstoff	BSB	Nitrat	Nitrit	Ammonium	Phosphat	X-Öl	Emulsion	Zellzahlen
17.7.	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
20.7.	3	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
24.7.	7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
27.7.	10	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
31.7.	14	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3.8.	17	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
7.8.	21	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10.8.	25	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
14.8.	28	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
17.8.	31	x		x	x	x	x	x	x	x		x
21.8.	35	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
24.8.	38	x		x	x	x	x	x	x			x
28.8.	42	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
31.8.	46	x		x		x	x	x	x			x
4.9.	49	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
11.9.	56	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

28 Tage nach dem Versuchsbeginn wurden 250 l des Mesokosmos I in ein zweites baugleiches Bassin gepumpt und beide Bassins mit frischem Meerwasser auf je 500 l aufgefüllt. In dieses zweite Bassin (Mesokosmos II) wurden zwei der oben beschriebenen Schwimmatten gelegt. Die Belüftung sowie die regelmässigen Messungen von Temperatur und Sauerstoffkonzentrationen erfolgten ebenso wie oben beschrieben für den Mesokosmos I. Dieser wurde in der Folge für weitere 28 Tage weiter untersucht wie oben beschrieben und beprobt wie in Tabelle aufgeführt.

Tab. 2.III: Probennahmeschema für das Mesokosmenbecken II

Datum	Versuchstag	DNA	RNA	Sauerstoff	BSB	Nitrat	Nitrit	Ammonium	Phosphat	X-Oil	Emulsion	Zellzahlen
14.8.	0	x		x	x	x	x	x	x		x	x
17.8.	3			x	x	x	x	x	x			x
21.8.	7	x		x	x	x	x	x	x			x
24.8.	10			x	x	x	x	x	x			x
28.8.	14	x		x	x	x	x	x	x			x
31.8.	17			x	x	x	x	x	x			x
4.9.	21	x		x	x	x	x	x	x			x
11.9.	28	x		x	x	x	x	x	x		x	x

56 Tage nach Versuchsbeginn wurden die Schwimmbarrieren und Schwimmmatten aus beiden Mesokosmen entnommen und entsorgt. Je 250 l Mesokosmenflüssigkeit aus Mesokosmos II wurden in ein drittes Becken sowie aus Mesokosmos I in Mesokosmos II gepumpt. Der Mesokosmos I wiederum wurde mit frischem Meerwasser wieder aufgefüllt auf 500 l. Der genaue Ablauf dieser Verschiebungen ist in Abb. 2.3 abgebildet. In dem dritten Becken wurde eine Sandfilterapparatur bestehend aus vier mit je 30 kg Seesand befüllten Röhren platziert. Mittels einer Tauchpumpe wurde Mesokosmenflüssigkeit aus dem umgebenden Becken kontinuierlich ab- und auf die vier Sandfiltersäulen gepumpt. Die Sandfiltersäulen waren an ihrem unteren Ende mit Glaswolle abgedichtet, welche ein Austreten von Sand verhinderte, Wasser jedoch passieren liess. Der Hintergrund dieser Massnahme war die Minimierung von bakterieller Zellmasse, Filtration von etwaigen Ölrückständen und Eliminierung von Ammonium-, Nitrat- und Nitrit-Ionen nach dem Vorbild eines Tropfkörpers in kommunalen Kläranlagen. Die in diesem Sandfilterbecken vorhandene Flüssigkeit wurde nach sieben Tagen mittels Indikatorpapier (Merck, Darmstadt) auf die Anwesenheit von Ölrückständen überprüft. Rückstandsfreies Abwasser wurde in die Nordsee zurückgeleitet und das Becken wiederum mit 250 l Mesokosmenflüssigkeit aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde bis zur vollständigen Beseitigung der gesamten Mesokosmenflüssigkeit wiederholt.

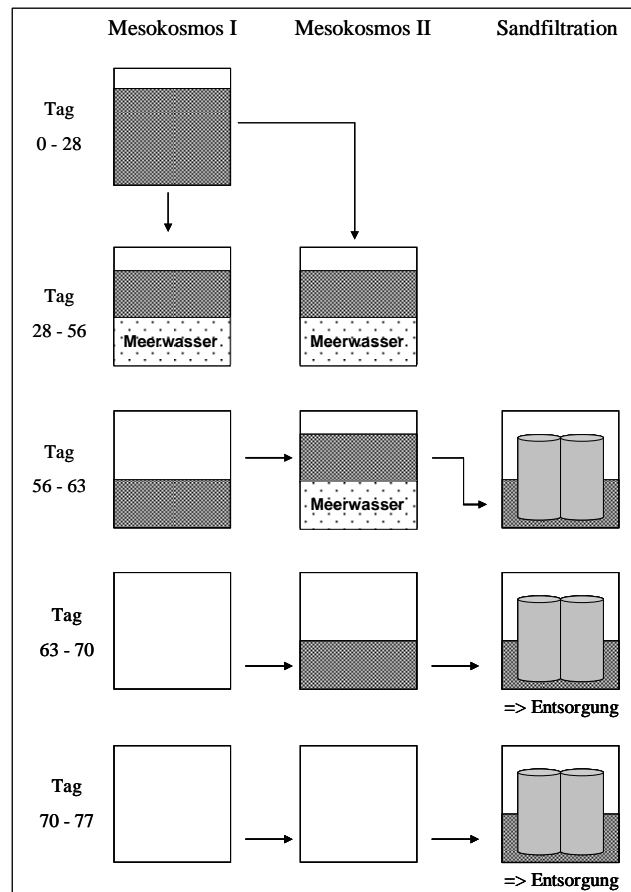


Abb. 2.2: Befüllungsschema der drei Mesokosmen- bzw. Reinigungsbecken

2.3 Mikrokosmenversuche zur Ermittlung der Auswirkung von Grazing auf den marinen Ölabbau (Predationsmikrokosmen)

Infolge der unten aufgeführten Ergebnisse des Mesokosmenversuches wurde eine dritte Reihe von Feldversuchen zur quantitativen Bestimmung der Auswirkungen von Protozoenfrass, bzw. Grazing, auf die ölabbauenden Mikroorganismen durchgeführt. Der Faktor Grazing ist sowohl in terrestrischen als auch marinen Ökosystemen nicht unbekannt und entsprechende Fachliteratur vorhanden ⁷¹, jedoch sind im Zusammenhang mit marinem Ölabbau bis dato nur wenige Fachartikel publiziert.

Der gängigste für Grazing-Experimente verwendete Giftstoff ist Cycloheximid (3-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl]glutarimide). Cycloheximid wirkt auf die Peptidyltransferasen während der Elongation von Polypeptidketten durch das Ribosom, somit wird die Proteinsynthese der betroffenen Organismen unterbunden. Da sich Ribosomen und andere Teile des Proteinsyntheseapparates von Prokaryoten und Eukaryoten stark unterscheiden, wirkt Cycloheximid sehr spezifisch auf Eukaryoten. Die hohe Toxizität des in den Versuchen verwendeten Cycloheximids begrenzt aufgrund der Verfügbarkeit des Cycloheximids und der komplizierten Entsorgung der hochgiftigen Versuchsansätze das Volumen der Versuche. Es wurden letztlich sechs Mikrokosmen mit einem Volumen von je 4 l verwendet.

Versuchsdurchführung

Hierzu wurden sechs Glasflaschen von je 5l Volumen (Schott) autoklaviert und mit 4l unsterilen Meerwassers, welches durch eine Saugleitung der Biologischen Anstalt Helgoland am 15. 05. 2007 der Nordsee entnommen wurde, befüllt. In jeden Mikrokosmos wurden je 10g Ölbindemittel, 10g Bunker C-Schweröl (IFO 380, Shell, Hamburg) sowie 5g Osmocote Pro – Langzeitdünger (s.o.) gegeben. Abweichend von den oben beschriebenen Mikrokosmen wurde keine Biomasse von *A. borkumensis* zugegeben, um ein sofortiges Wachstum von räuberischen Protozoen und eine damit verbundene Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden.

Als Sterilkontrollen wurden zwei 2l – Glasflaschen (Schott) mit 2l autoklaviertem Meerwasser, je 5g ethanol-sterilisiertem Ölbindemittel, 5g Bunker C-Schweröl (IFO 380, Shell, Hamburg), welches auf ca. 120° - 130°C erhitzt wurde, sowie 2,5g ethanolsterilisiertem Osmocote Pro Dünger (Scotts) befüllt. Das Bunker C-Schweröl wurde wie oben beschrieben mit Squalen als internem Standard behandelt.

Die acht Mikrokosmen wurden vier Wochen lang bei 18°C auf einem Schüttler bei 90 rpm inkubiert. Es wurden dabei nach 0, 3, 8, 11, 15, 24 und 28 Tagen jeweils 2 l Mikrokosmenflüssigkeit aus den sechs 5 l-Flaschen entnommen und durch 2l autoklaviertes Meerwasser, welches ursprünglich ebenfalls am 15.05.2007 entnommen wurde, ersetzt.

Je 200 ml der entnommenen Proben wurde mittels eines Bottle-Top-Filters wie unten beschrieben durch 0,2µm-Nitrocellulosefilter filtriert. 50 ml jeder Probe wurden durch Paraformaldehyd in einer Endkonzentration von 15 (w/v) für die Mikroskopie fixiert. Das restliche Probenvolumen wurde für das Befüllen von Winklerflaschen für die Bestimmung des Biologischen Sauerstoffbedarfs verwendet oder in Kanistern zur späteren Entsorgung gesammelt.

28 Tage nach dem Beginn des Versuches wurden die ölkontaminierten Ölbindemittelreste aus allen acht Mikrokosmenflaschen entfernt und die Kohlenwasserstoffe in 100 ml Cyclohexan extrahiert. Die Verbleibende Mikrokosmenflüssigkeit wurde in Kanistern gesammelt und entsorgt.

Verwendetes Ölbindemittel

Für die Frassversuche wurden zwei unterschiedliche Ölbindemittel eingesetzt: Analog zu den oben beschriebenen Mesokosmenversuchen wurde zum einen X-Oil verwendet. Als Vergleich wurde ferner ein neuartiges Ölbindemittel aus speziell bearbeiteten Polypropylenfasern verwendet. Dieses als SuperM (Hellmann-Tech, Lehrte) bezeichnete Ölbindemittel in Form eines weißen, faserigen Schaums zeichnet sich ebenfalls durch eine große Oberfläche aus, hat jedoch eine vierfach höhere Ölbindekapazität von 20:1 (w/w) im Vergleich zu X-Oil. Desweiteren gibt SuperM im Gegensatz zu X-Oil keine Farbstoffe, Salze oder Schwermetalle ab oder verändert den pH-Wert des umgebenden Wassers. Es hat eine geringere Dichte und eine bessere Schwimmfähigkeit. Bei den oben beschriebenen Versuchen wurden je drei Mikrokosmen und eine Sterilkontrolle mit X-Oil (Ansätze XA, XB, XC), die übrigen mit SuperM (Ansätze WA, WB, WC) behandelt.

Verwendung von Cycloheximid

Wie bereits erwähnt wurde Cycloheximid für die Eliminierung von räuberischen Protozoen verwendet. Dabei wurden je drei unterschiedliche Ansätze für die X-Oil- bzw. die SuperM-Mikrokosmen verwendet.

Zur Unterscheidung der allgemeinen Unterschiede des Ölabbau durch marine hydrocarbonoclastische Mikrobengemeinschaften in An- oder Abwesenheit von räuberischen Protozoen wurde je eine Flasche 28 Tage ohne Behandlung mit Cycloheximid inkubiert (Ansatz XA und WA), eine zweite von Beginn des Versuches an mit Cycloheximid in einer Endkonzentration von 200 mg/l versetzt (Ansätze XB und WB). Da es während der Probenahmen zu einem Flüssigkeitsaustausch kam und die Cycloheximidkonzentration bei jeder Probennahme halbiert worden wäre, wurde jeweils die entsprechende Menge an Cycloheximid-Stammlösung resubstituiert, um eine konstante Endkonzentration von 200 mg/l beizubehalten.

Da sich in vorherigen Versuchen gezeigt hat, dass Protozoen hauptsächlich in Verbindung mit den durch ölabbauende Mikroorganismen gebildeten Biofilmen auftreten, sollte in einem dritten Mesokosmensatz (Ansätze XC und WC) Cycloheximid in der besagten Endkonzentration erst zugegeben werden, sobald eine Emulsionsbildung eintreten und Biofilme mikroskopisch sichtbar werden würden, in diesem Fall 19 Tage nach Beginn des Versuches. Bei den Probenahmen wurde – analog zu den Ansätzen XB und WB jeweils Cycloheximid zugegeben, um die Konzentration von 200 mg/l aufrechtzuerhalten.

2.4 Versuche zur Lagerung von Biomasse ölabbauender mikrobieller Gemeinschaften

Eines der wesentlichen Probleme bei der Bioaugmentation – der Zugabe spezialisierter Mikroorganismen zu schadstoffbelasteten Systemen – besteht in der Ausschwemmung und Verdünnung der Bakterien nach der Zugabe. Dies ist insbesondere ein großes Problem in aquatischen Systemen, vor allem im Meer, da es stärkere Dünung (Wellenbewegungen) und Strömungen gibt. Als Testorganismus wurde das bereits oben erwähnte Bakterium *Alcanivorax borkumensis* verwendet. Für eine technisch einfache Handhabung wurde in den folgenden Versuchen das Öl wiederum zuvor an ein Ölbindemittel – in diesem Fall SuperM, weil dieses gegenüber X-Oil durch bessere Schwimmfähigkeit und Handhabung im Vorteil ist – gebunden. Die unten beschriebene Methode wurde entwickelt, um mit möglichst geringem technischem Aufwand und ohne Verwendung komplizierter Laborgeräte ölabbauende Mikroorganismen auf Trägermaterial zu immobilisieren, langfristig zu lagern und in eine Form zu bringen, die im Falle einer katastrophalen Ölverschmutzung auch durch biotechnologisch oder technisch nicht geschultes Personal sachgerecht gehandhabt werden kann.

Für den folgenden Versuch wurden 32 g SuperM (Hellmann-Tech, Lehrte) durch 70% (v/v) Ethanol sterilisiert und in 32 Kugeln zu je 1 g geformt. Auf je 16 Kugeln des Ölbindemittels wurden entweder 0,5 ml sterilfiltriertes Hexadekan oder 0,5 ml auf 120°C erhitztes Bunker C –Schweröl (Shell, Hamburg) pro Kugel gegeben.

Es wurden vier Erlenmeyerkolben zu je 2 l mit je 1000 ml Flüssigmedium befüllt: Zwei Kolben wurden mit ONR7a-Flüssigmedium befüllt; dieses enthält bereits genug Nährstoffe, um einen Ölabbau durch *Alcanivorax borkumensis* einzuleiten. Zu diesen Kolben wurde Biomasse von *Alcanivorax borkumensis* aus einer Vorkultur in einer Endkonzentration von 10.000 Zellen pro ml Medium gegeben. In diese Kolben wurden entweder acht mit Hexadekan oder acht mit Bunker C – Schweröl behandelte Ölbindemittel-Kugeln gegeben. In zwei weitere Kolben wurde gealtertes Meerwasser, welches am 28. 3. 2007 in Carolinensiel bei Wilhelmshaven aus der Nordsee entnommen und darauf bei 4°C gelagert wurde, gefüllt.

Der Ort Carolinensiel liegt am weitesten entfernt von den Zuflüssen von Elbe, Weser und Ems, so dass das Meerwasser einen möglichst geringen Einfluss durch Süßwasser erfahren hat. Zu dem Meerwasser wurden 5 g des oben beschriebenen Osmocote Pro – Düngers gegeben. In jeden der mit Meerwasser befüllten Kolben wurden entweder acht mit Bunker C – Schweröl oder Hexadekan behandelte Kugeln des Ölbindemittels gegeben. Alle vier Kolben wurden 21 Tage lang bei 20°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach diesen 21 Tagen waren eine starke Emulsionsbildung in der *A. borkumensis* – Reinkultur mit Bunker C –Schweröl (Bezeichnung „BA“) und eine leichtere im entsprechenden Meerwasseransatz („BS“) zu erkennen. Dichte Biofilme wuchsen auf den Kugeln in beiden Meerwasseransätzen.

Die Kugeln wurden aus den Kolben entnommen, je eine Kugel pro Ansatz zurückbehalten, die übrigen in entsprechend markierte 50 ml PP-Röhrchen gegeben und mit 30 ml sterilem ONR7 aufgefüllt. Zu diesen Ansätzen wurden 7,5 ml eisgekühltes Dimethylsulfoxid (DMSO) gegeben, so dass eine Endkonzentration von 20% (v/v) vorlag. Die Ölbindemittelkugeln wurden 20 Minuten auf Eis inkubiert und danach die Kugeln aus den PP-Röhrchen in sterile Petrischalen transferiert. Um eine möglichst gute Konservierung zu ermöglichen wurden die Petrischalen in einen Tieftemperatur-Kühlschrank bei -80°C schockgefroren. Nach 30 min wurden die Petrischalen entnommen, die Ölbindemittelkugeln in 50 ml – PP-Röhrchen transferiert und in einem Kühlschrank bei -20°C bis zur späteren Untersuchung gelagert. Es wurde unmittelbar nach dem Gefrieren und danach nach 3, 7, 14, 28, 56, sowie 168 Tagen pro Ansatz eine Kugel entnommen.

Jede Kugel wurde in einem 50 ml PP-Röhrchen in 15 ml sterilem ONR7a-Flüssigmedium resuspendiert, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach 30 s mittels eines Vortex geschüttelt. Ein Milliliter der Zellsuspension wurde entnommen und Verdünnungsreihen in sterilen 96-Lochplatten mittels sterilem ONR7a-Medium bis zu einer Verdünnung von 10^{-9} hergestellt. Je 100 µl der Verdünnungen wurden für die unten beschriebene MPN-Kulturmethode sowie den „Sheen screen“-Test für emulsionsbildende Bakterien verwendet.

2.5 Licht-/Phasenkontrastmikroskopie und Zellzählungen

Für die Lichtmikroskopie, Phasenkontrastmikroskopie, Zellzählungen sowie Bild- und Filmaufnahmen wurde ein Zeiss Axioskop Mikroskop (Zeiss, Jena) mit dazugehöriger Digitalkamera eingesetzt. Zur Aufnahme, Bearbeitung und Konvertierung von Bild- und Filmdaten wurde die dazugehörige AxioCam-Software (Zeiss, Jena) eingesetzt.

Für die Zellzählungen von Prokaryoten wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Für ein statistisch relevantes Ergebnis wurde jede Probe mindestens dreimal ausgezählt, wobei wenigstens 8 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten ausgezählt wurden. Im Falle von Lösungen mit einer sehr hohen Zellzahl wurden diese so verdünnt, dass pro Kleinquadrat zwischen 5 und 30 Zellen zu erkennen waren. Zellzählungen von Eukaryoten (Flagellaten, Ciliaten, Amöben) wurden mittels einer Sedgewick-Rafter-Kammer durchgeführt. Diese Kammer fasst je 1 ml Probenvolumen, welches durch ein Raster von 1000 Feldern aufgeteilt wird. Es wurden mindestens je Probe drei Zählungen von je 500 Feldern durchgeführt.

Für die Zählungen von Prokaryonten und Eukaryonten wurden Präparate verwendet, die zuvor wie oben beschrieben in 1% Paraformaldehyd fixiert wurden.

2.6 Sauerstoffmessungen mittels Sauerstoffelektrode

Für die Sauerstoffmessungen mittels Sauerstoffelektrode wurde ein OxyScan Graphic – Messgerät (UMS, Meinersen) verwendet. Dieses wurde vor jeder Messung kalibriert und während der Messung mindestens 30s in der zu vermessenden Flüssigkeit mittels leichten Rührens inkubiert.

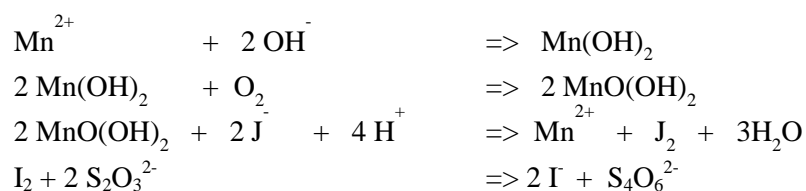
2.7 Sauerstoffmessungen nach Winkler (Modifikation nach Grasshoff und Kalle)⁷²

Da Sauerstoffelektroden eine Glasmembran verwenden, welche durch Kontakt mit freiem Öl auf der Wasseroberfläche verkleben und die Messwerte verfälschen sowie die Elektrode beschädigen, wurde für einen Teil der hier aufgeführten Versuche eine chemische Messung des Sauerstoffs benötigt.

Insbesondere in Mikro- und Mesokosmen, die für den optimalen Ölabbau permanent belüftet werden müssen, ist es darüber hinaus notwendig, eine Messung des Biologischen Sauerstoffbedarfs (BSB, bzw. BOD – biological oxygen demand) vorzunehmen, da Elektroden nur eine Bestimmung des im Moment der Messung gelösten Sauerstoffs ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurde die chemische Sauerstoffbestimmung nach Winkler modifiziert und auf Mikro- und Mesokosmen angewandt. Für diese Messung wurde zunächst eine Probe des zu untersuchenden Wassers genommen und blasenfrei sowie ohne Verwirbelungen in eine Reihe von Winkler-Schliffstopfenflaschen gefüllt und luftdicht abgeschlossen. Für jeden Messzeitpunkt wurden 18 Flaschen befüllt, wobei drei Flaschen für eine sofortige Messung verwendet, jeweils drei zunächst im Dunkeln im temperierten Versuchsraum gelagert und an den folgenden fünf Tagen herangezogen wurden.

Die Sauerstoffmessung nach Winkler basiert auf dem Prinzip der Manganometrie. Der gelöste Sauerstoff oxidiert dabei Mn(IV), welches durch weitere Reaktionen Iodid-Ionen zu elementarem Iod oxidiert, welches wiederum mittels einer Natriumthiosulfat-Masslösung zurücktitriert wird. Es laufen dabei die folgenden Reaktionen ab:



Für die Messung werden die Flaschen vorsichtig geöffnet und 0,25 ml einer 80%tigen (w/v) $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ zugegeben.

Da sich unter Umständen durch die massive Zugabe von ammonium- und nitrathaltigen Düngern durch mikrobiologische Prozesse Nitrit in den Probenlösungen bilden kann, wurde als Abweichung vom ursprünglichen Protokoll eine Kaliumiodidlösung mit 48% (w/v) Natriumhydroxid, 15% (w/v) Kaliumiodid und 2% (w/v) Natriumazid (NaN_3) hergestellt und 0,25 ml dieser Lösung in jede Flasche gegeben. Natriumazid neutralisiert dabei die Nitrit-Ionen, ohne den Sauerstoffgehalt zu verändern. Die Flaschen wurden verschlossen, kräftig geschüttelt und 1h im Dunkeln inkubiert. In der Folge wurden die Lösungen mit 19%tiger Salzsäure (w/v) angesäuert und in ein Becherglas gegeben. Die durch Iod gelb gefärbte Lösung wird mit 1 ml einer 1%tigen (w/v) Stärke-Lösung versetzt, um einen blauen Iod-Stärke-Komplex zu erzeugen. Es wird dann mit 0,01 n Natriumthiosulfat-Lösung (Titrisol, Merck) mittels einer Digitalburette (Brand, Wertheim) bis zum Farbumschlag titriert.

Die Konzentrationen des gelösten Sauerstoffs werden anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{mg O}_2/\text{l} = \frac{a \times f \times 0,08 \times 1000}{(b - R)}$$

(a = Verbrauch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; f = Faktor ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$); b = Volumen der Probeflasche; R = Reagenzienzugabe). Der Faktor f der Natriumthiosulfatlösung wird dabei durch eine Titration gegen Kaliumiodat-Lösung bestimmt:

$$\begin{aligned} & 10 \text{ ml } 0,01 \text{ n KJO}_3\text{-Lsg.} \\ & + \quad 0,1 \text{ g KJ} \\ & + \quad 80 \text{ ml dest. Wasser} \\ & + \quad 2 \text{ ml } 2 \text{ n H}_2\text{SO}_4 \\ \\ & \text{ml } 0,01 \text{ n KJO}_3 \\ f = & \frac{\text{ml } 0,01 \text{ n KJO}_3}{\text{Verbrauch Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \end{aligned}$$

Die erhaltenen Werte werden in einem Diagramm aufgetragen und mittels des Programms GraphPad Prism Zerfallskurven für jede Probe zum Zeitpunkt der Probennahme berechnet. Der Steigungsfaktor der Zerfallskurven jedes Messzeitpunktes wird wiederum in ein Diagramm übertragen. Der Steigungsfaktor ist hierbei proportional zur Respirationsrate der Mikroorganismen.

2.8 Photometrische Bestimmung der Konzentrationen gelöster Nährstoffe nach Grasshoff¹³⁶

Gelöste Nährstoffe sind neben Sauerstoff eine der essentiellen Voraussetzungen für den biologischen Abbau von Öl im Meer. Das Meerwasser enthält im Allgemeinen sehr wenige Nährstoffe, wobei in Randmeeren oder Ästuaren durch den Eintrag aus Flüssen durchaus auch hohe Nährstoffkonzentrationen vorliegen können. In der Regel muss für den biotechnologischen Abbau von Öl im Meer ein nicht unerheblicher externer Nährstoffeintrag durch den Menschen erfolgen. Als Standardmethode für die Nährstoffbestimmung für Ammoniumionen, Nitrate, Nitrit sowie Phosphat wurde eine photometrische Bestimmung nach Grasshoff durchgeführt. Diese vier Verbindungen sind für den Ölabbau von elementarer Bedeutung; es wird im Allgemeinen von einem optimalen Verhältnis von Kohlenstoff : Stickstoff : Phosphor von 100:10:1 für den biologischen Ölabbau im Meer ausgegangen, wobei jedoch auch Spurenelemente wie Eisen und Magnesium einen Einfluss haben. Die photometrische Bestimmung von Nährstoffen nach Grasshoff zählt zu den Standardmethoden für Langzeituntersuchungen an der Biologischen Anstalt Helgoland. Für die Messungen der Proben aus den Mesokosmen wurden Proben von je 500 ml Meskosmenflüssigkeit zu jedem Messzeitpunkt entnommen.

Diese Proben wurden wie weiter unten beschrieben mittels eines Bottle-Top-Filter filtriert, wobei zunächst ein 3µm-Nitrocellulosefilter (Sartorius, Göttingen) und danach ein Nitrocellulosefilter mit einem Porendurchmesser von 0,2µm zum Einsatz kam um Biomasse, die die Messungen verfälschen könnte, zu entfernen. Für die Messungen der Konzentrationen gelöster Nährstoffe wurden pro Messung und Messzeitpunkt Dreifachbestimmungen zu je 15 ml Messlösung durchgeführt. Hierfür wurden die von Grasshoff beschriebenen Lösungen, Protokolle und Methoden für Ammonium-, Nitrat-, Nitrit- und Phosphat-Ionen verwendet. Da Nitrit-Ionen nicht direkt photometrisch nachgewiesen werden kann, wurde ein Aliquot der zu untersuchenden Lösung in einer Säule zu Nitrat oxidiert und mittels der von Grasshoff beschriebenen Methode die Konzentration von Nitrat bestimmt¹³⁶. Die Konzentration des Nitrits wurde aus der Differenz der Nitratkonzentration von oxidiert und unbehandelter Probenlösung berechnet. Für sämtliche photometrischen Messungen wurde ein Perkin Elmer Lambda 12 Photometer (Waltham, Massachusetts, USA) verwendet.

2.9 Fluorimetrische Bestimmung der Konzentrationen gelöster DNA mittels PicoGreen

Als verlässliche Methode zur Quantifizierung von Biomasse in den Mikrokosmenversuchen wurde eine fluorimetrische Messung der Konzentrationen doppelsträngiger DNA herangezogen. Diese Methode bietet die Möglichkeit große Mengen von Proben in kurzer Zeit durch ein standardisiertes Verfahren zu untersuchen. Für eine fluorimetrische Messung wurde der DNA-Farbstoff PicoGreen (Molecular Probes, Eugene, USA) eingesetzt. Dieser Farbstoff bindet selektiv an doppelsträngige DNA und wird durch diese Bindung zur Fluoreszenz befähigt. Der ungebundene Farbstoff verfügt nur über minimale Fluoreszenz, wodurch nahezu keinerlei Hintergrundstrahlung im Falle von Fluoreszenzmessungen auftritt. PicoGreen wird bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und emittiert Lichtwellen von 520 nm.

Für die Quantifizierung von DNA in Umweltproben wird zunächst eine Eichgerade von PicoGreen erstellt. Hierzu wird PicoGreen Stammlösung (200fach konzentriert in Dimethylsulfoxid) 1: 200 verdünnt in TE-Puffer (10 mM Tris HCL, 1 mM EDTA, pH 7,5). Für jede Messung wird 1 ml der PicoGreen Arbeitslösung verwendet. Für eine Eichgerade wird zunächst eine 2µg/ml (w/v) – Eichlösung doppelsträngiger DNA (Heringssperma-DNA) in TE-Puffer und darauf weitere Eichlösungen mit Konzentrationen von 1 ng/ml – 1000 ng/ml dsDNA durch Verdünnung mit TE-Puffer hergestellt. Je 1 ml dieser Eichlösungen wird zu 1 ml PicoGreen-Arbeitslösung in Einwegküvetten aus Polypropylen gegeben und mittels eines Fluorimeters vermessen. Die erhaltenen Werte der fluorimetrisch ermittelten Eichgerade werden mittels eines Tabellenkalkulationsprogrammes in einen Graphen aufgetragen, eine Korrelationsgerade berechnet und die daraus resultierende Formel für die Berechnung der DNA-Konzentrationen in den zu untersuchenden Umwelt- oder Mikrokosmenproben genutzt.

Für die fluorimetrische Messung der DNA-Konzentration in Mikrokosmen wurden Proben von je 2 ml entnommen und in Eppendorfgefäße gefüllt. Diese wurden in einem Heizblock 10 Minuten bei 96°C gekocht, um die in der Biomasse enthaltene DNA freizusetzen. Weil die Eichgerade von PicoGreen nur im Bereich von 1 – 1000 ng/ml DNA linear verläuft, wurden die erhaltenen DNA-Lösungen mit TE-Puffer in einer Verdünnungsreihe schrittweise 1:10 verdünnt und die resultierenden Lösungen ebenso behandelt wie die Proben der oben beschriebenen Eichgerade. Anhand der Verdünnungsreihe

wurde ein allgemeiner Verdünnungsfaktor für alle weiteren Probenlösungen ermittelt und die Proben nach dem oben beschriebenen Prinzip verdünnt, behandelt und fluorimetrisch vermessen.

2.10 Filtration von Biomasse aus Mikrokosmenflüssigkeit

Zur Gewinnung von Biomasse aus Mikro- und Mesokosmenflüssigkeit wurde für alle Versuche ein wieder verwendbares Bottle-Top-Filtrationssystem von Nalgene (Hereford, Grossbritannien) in Verbindung mit 0,2µm Nitrocellulose-Filterscheiben mit 49mm Durchmesser (Sartorius, Göttingen) verwendet. Je nach Versuch wurde 100 – 200 ml Mesokosmenflüssigkeit in den Filtertopf des mit Filterscheibe autoklavierten Bottle-Top-Filters gegeben, nachdem dieser auf eine autoklavierte 1l-Glasflasche (Schott) geschraubt wurde. Die Apparatur wurde an eine Unterdruckpumpe (Millipore) angeschlossen und ein Unterdruck von -500 bis -600 mbar angelegt. Nach kompletter Passage der Mesokosmenflüssigkeit wurde der Bottle-Top-Filter geöffnet, der Nitrocellulose-Filter mittels zweier mit einem Bunsenbrenner abgeflammter Pinzetten entfernt und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Zum Zwecke der DNA-Extraktion wurden die Filter bei -20°C bis zur Extraktion gelagert. Probenmaterial, welches für eine Extraktion der RNA filtriert wurde hingegen sofort nach der Filtration auf Eis gelagert und in einen Tiefkühlschrank transferiert sowie bei -80° C gelagert.

2.11 Modifizierte Phenol-Chloroform-Extraktion nach Wichels⁷³

Zur Extraktion von genomischer DNA wurde eine Modifikation der Phenol-Chloroform-Extraktion nach Sambrook und Russel verwendet ⁷³. Diese berücksichtigt zum einen den Gehalt an verschiedenen Salzen in den auf Meerwasser basierenden Mikrokosmen als auch die Kontamination mit Schwermetallen, Schwefel und chlorierten Kohlenwasserstoffen durch Spuren des Bunker C-Schweröls.

Für die Extraktion wurden die mit Biomasse überzogenen Nitrocellulose-Filterscheiben aus dem Kühlschrank entfernt, aufgetaut und mittels eines mit 70%tigem Ethanol gereinigten Skalpell und einer mit einem Bunsenbrenner abgeflammten Pinzette zunächst in Stücke von circa 5 x 5 mm Größe zerschnitten. Etwa ein Viertel bis die Hälfte der Filterstücke wird in 2 ml – Eppendorfgefäße transferiert und in 700µl STE-Puffer resuspendiert. Um die Zellwände der enthaltenen Bakterien zu schwächen und eine bessere Lysis der Zellen zu ermöglichen, wurden 18,4µl einer Lysozymlösung (10 mg/ml) zugegeben und dieses Gemisch nach Mischen mittels eines Reagenzglasrührers (Vortex) 30 min bei 37°C inkubiert. Zur endgültigen Lysis der bakteriellen Zellen wurden 73,5 µl Tris-EDTA-Puffer (pH 8,0) und 44 µl 20% (w/v) SDS – Tris-EDTA-Puffers hinzugegeben. Nach kurzem Mischen wurde die Lösung 60 min bei 50°C inkubiert. Zur Abtrennung von Zelltrümmern und Filtermaterial erfolgte eine Zentrifugation bei 16000g und 4°C für 10 min. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und durch Zugabe von 84µl 5M Natriumchloridlösung in der Lösung enthaltene cytosolische Proteine ausgefällt. Zur Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren wurden 920 µl einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1; Roth) zugegeben. Es folgte ein wie oben beschriebener Zentrifugationsschritt. Die obere, wässrige Phase wurde darauf in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und der letzte Schritt mit 920 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1; Roth) wiederholt. Die Nukleinsäuren in der daraus hervorgehenden wässrigen Phase werden in einem frischen Eppendorfgefäß unter Zugabe von 920µl Isopropanols bei 4°C über Nacht gefällt. Am Folgetag werden die Gefäße in einer Tischzentrifuge bei maximaler Drehzahl (16000 – 20000 g) bei

4°C 45 min lang zentrifugiert und danach der Überstand vorsichtig dekantiert. Eventuelle Isopropanolreste werden mittels einer Präzisionspipette entfernt. Das Eppendorfgefäß wird darauf mindestens 1 h unter einem Abzug oder einer Cleanbench getrocknet. Eine Trocknung des Pellets mittels Vakuumkonzentrator („Speedvac“) führte vermutlich durch Druckunterschiede bei der Öffnung des Gerätes nach der Trocknung zu massiven Verlusten von DNA, weshalb diese Methode zur Trocknung ungeeignet ist. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl destillierten Wassers resuspendiert.

Da insbesondere bei der Extraktion von DNA aus Mikrokosmen, welche X-Oil-Fasern enthielten, Kontaminationen durch Chemikalien, Schwermetalle und Farbstoffe auftraten, die folgende PCR-Schritte behinderten, wurde zusätzlich eine Dialyse-Schritt durchgeführt. Hierzu wurden 10 ml destillierten Wassers in eine Plastikpetrischale gegeben und Nitrocellulose-Filter (0,025µm VSWP, Millipore) auf dessen Oberfläche flottiert. Auf die Oberfläche des Filters wurden 10 – 20 µl der konzentrierten DNA-Lösung gegeben und nach 30 min wieder entfernt. Das Volumen der dialysierten DNA-Extrakte kann hierbei zunehmen, was zu einer leichten Verdünnung führt. Im Falle schlechter Resultate bei PCR-Amplifikationen ist dieser Schritt zu wiederholen. Pro Dialyseschritt kann die Konzentration von Salzen und anderen Kontaminationen dabei um den Faktor 1000 gesenkt werden.

Die Qualität und Quantität der isolierten genomischen DNA mittels eines 0,8%tigen Agarosegels durch Elektrophorese bei 100 V für circa 40 min, Färbung mit Ethidiumbromid und Visualisierung durch ein Geldokumentationssystem (Biorad bzw. Herolabs) überprüft.

2.12 Extraktion bakterieller DNA von Ölbindemittel-Oberflächen

Wegen der massiven Kontamination durch Bunker C-Schweröl und der Bildung von Biofilmen durch die auf dem Öl lebenden Bakterien wurde für die DNA-Extraktion von Ölbindemittel-Proben das DNA FastSpin Kit for Soil (QBiogene) unter Verwendung des Protokolls des Herstellers verwendet. Dieses Kit verwendet einen mechanischen Aufschluss der Bakterien mittels Bead Beating unter Verwendung des FastPrep-Instruments (QBiogene). Durch die Verwendung dieser Technik werden die auf dem Ölbindemittel aufgewachsenen Biofilme im Gegensatz zu Phenol-Chloroform-Extraktion zunächst abgetrennt und dann mechanisch lysiert. Für die Extraktion wurde jeweils etwa 0,5 g Ölbindemittel verwendet. Die Extrakte wurden auf einem 0,8%tigen Agarosegel bei einer Spannung von 100 V circa 40` aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Geldokumentationssystem (BioRad) visualisiert. Die durch das Kit erhaltenen DNA-Extrakte werden unverändert für die PCR eingesetzt.

2.13 Extraktion eukaryotischer DNA aus Mikrokosmen/Mesokosmen-Flüssigkeit

Wie aus verschiedenen Publikationen hervorgeht, unterscheiden sich die Extraktionen von bakterieller genomischer DNA und jener von Protozoen erheblich. Während die empfindlicheren Zellwände von Bakterien relativ einfach durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion zerstört werden und diese Methode hohe Ausbeuten an isolierter DNA ermöglichen, ist sie im Falle von Protozoen relativ ineffektiv.

Hierfür gibt es mehrere Gründe; zunächst haben Protozoen aufgrund der fehlenden Zellwände relativ robuste, schwer zu zerstörende Zellmembranen. In einigen Fällen sind auch Panzer aus Cellulose (Dinoflagellaten), eine Schutzhülle aus Glycolipiden und Glycoproteinen, die Glycokalyx (Amöben),

oder eine besonders robuste Zellmembran, die Pellicula (Cilliaten). Desweiteren kann durch die im Vergleich zu Prokaryonten größere, in Chromosomen angeordnete DNA durch Scherkräfte, die bei der Phenol-Chloroform-Extraktion häufig vorkommen leichter beschädigt werden.

Für die Extraktion eukaryotischer DNA wurde daher in Anlehnung an Del`Anno et al. das FastPrep Kit for Soil (QBiogene) unter Verwendung des Protokolls des Herstellers verwendet ¹³⁷. Das Ausgangsmaterial für diese Extraktion bildete hierbei Biomasse, welche wie oben beschrieben beschrieben auf 0,2µm Nitrocellulose-Filter filtriert wurde. Das FastPrep Kit beinhaltet Säulen mit Glaskügelchen, welche für einen Bead Beating – Schritt mit dem FastPrep-Instrument verwendet werden.

Die Extrakte wurden auf einem 0,8%tigen Agarosegel bei einer Spannung von 100V circa 40` aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Geldokumentationssystem visualisiert.

Die extrahierte DNA wurde unverändert für die folgende PCR eingesetzt.

2.14 Extraktion bakterieller RNA aus Mikrokosmen/Mesokosmen-Flüssigkeit sowie von Ölbindemittel-Oberflächen

Aufgrund der hohen Instabilität von RNA in Umweltproben wurde für die RNA-Extraktion von Mesokosmenflüssigkeit sowie Ölbindemittel-Proben das RNA FastSpin Kit for Soil (QBiogene) unter Verwendung des Protokolls des Herstellers verwendet. Dieses Kit verwendet einen chemischen Aufschluss der Bakterien mittels heißer Phenol-Chloroform-Extraktion. Für die Extraktion wurde jeweils etwa 0,5 g Ölbindemittel bzw. eine halbe Filterscheibe eines 49mm 0,2µm Nitrocellulosefilters (Sartorius, Göttingen) verwendet. Die Extrakte wurden auf einem 0,8%tigen Agarosegel bei einer Spannung von 100V circa 40` aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Geldokumentationssystem visualisiert. Die durch das Kit erhaltenen RNA-Extrakte wurden sofort nach der Extraktion in adäquatem, durch das Kit geliefertem Puffer bei -80°C gelagert, erst vor Gebrauch aufgetaut.

Da eine völlige Beseitigung der DNA aus den Umweltproben mittels dieses Kits in der Regel nicht ausgeschlossen werden kann, wurde jeweils ein Aliquot von 10µl jeder Probe einer sauren Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen.

2.15 Saure Phenol-Chloroform-Extraktion zur Abtrennung von DNA-Kontaminationen in RNA-Extraktionen

Wie bereits erwähnt ist eine Kontamination von RNA durch DNA im Laufe einer RNA-Extraktion mittels des RNA FastSpin Kits nicht immer zu vermeiden. Jedoch können bereits geringe Mengen von DNA die weiterführenden Experimente erschweren oder Ergebnisse verzerren. Durch Phenol-Extraktion ist eine Trennung verschiedener Nukleinsäuren möglich, da die Phasentrennung von DNA und RNA in Phenol und Wasser vom pH-Wert abhängig ist. Bei einem pH-Wert von 4-6 wird DNA in der organischen Phase und der Interphase zurückgehalten.

Für die saure Phenol-Chloroform-Extraktion wurden alle Arbeitsoberflächen und Pipetten mittels RNase Zap (Ambion, Austin, USA) dekontaminiert. 10µl der RNA-Extrakte, welche durch das RNA FastSpin Kit erhalten wurden, wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Wasser (Ambion, Austin, USA) aufgefüllt auf ein Gesamtvolumen von 500 µl.

Zu diesem Ansatz wurden 500 µl saure Phenol-Chloroform-Lösung (5:1, pH 4,7; Ambion, Austin, USA) gegeben, das Gemisch 10 min bei maximaler Drehzahl in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) bei 4°C zentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und 50µl einer RNase-freien 3M Natriumacetat-Lösung zugegeben. Zur Präzipitation der RNA wurden 1100µl reinen Ethanol zugegeben, die Lösung durch Invertieren gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Am Folgetag wurde der Überstand dekantiert und Reste des Ethanol mit einer Präzisionspipette entfernt. Das resultierende Pellet wurde unter einer Cleanbench getrocknet und in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. 2 µl der Extrakte wurden auf einem 1,5%tigen Agarosegel bei einer Spannung von 100V circa 40` aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Geldokumentationssystem visualisiert.

2.16 Reverse Transkription bakterieller RNA aus Mikrokosmen/Mesokosmen-Flüssigkeit sowie von Ölbindemittel-Oberflächen

Um mittels PCR bestimmte Fragmente der RNA zu amplifizieren, ist eine reverse Transkription der RNA in einzelsträngige, so genannte cDNA (komplementäre DNA) notwendig, da die für die allgemein für die PCR eingesetzten Taq-Polymerasen DNA-spezifisch und -abhängig sind.

Daher wird zunächst eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, auch Reverse Transkriptase (RT) genannt, eingesetzt, um RNA-Stränge zu amplifizieren, jedoch DNA-Amplifikate zu erhalten. Dieses Enzym wird meist von Retroviren produziert, um ihr aus RNA bestehendes Genom innerhalb einer Wirtszelle in DNA umzuwandeln. In kommerziellen Kits handelt es sich dabei meist um modifizierte Polymerasen des „Moloney Murine Leukemia Virus“ (M-MLV RT) oder „Avian Myeloblastosis Virus“ (AMV RT).

In diesem Fall wurde das Reverse Transcription System Kit (Promega, Madison, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das Kit nutzt dabei die oben beschriebene AMV Reverse Transkriptase. Da das Ziel der Transkription die 16S rRNA der marinen Mikrobengemeinschaften ist, wurden die mit dem Kit gelieferten „random primers“ genutzt. Es handelt sich dabei meist um ein Gemisch verschiedener Nucleotid-Hexamere, die in der Lage sind, sich als Primer an jede mögliche Stelle einer RNA anzulagern und eine Amplifikation durch die AMV Reverse Transkriptase zu ermöglichen. Es kommt somit zu einer unspezifischen Amplifikation aller RNA-Fragmente, unabhängig von ihrer Basenabfolge oder –zusammensetzung. In der Folge entsteht ein Gemisch unterschiedlich langer cDNA-Fragmente, wobei jedoch bei der folgenden PCR wiederum spezifische, durch die Wahl der Primer definierte Bereiche, amplifiziert werden.

Für die Reaktion wurde ein Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von je 20µl nach Vorgaben des Herstellers unter Verwendung der „Random Primer“ hergestellt. Je 2 µl der aus der sauren Phenol-Chloroform-Extraktion hervorgegangenen Extrakte werden als Template für die folgende Reaktion eingesetzt.

Die Reaktionsgemische wurden zunächst 10 min bei Raumtemperatur, darauf 15 min in einem Heizblock bei 42°C inkubiert. Im Anschluss wurde die AMV Reverse Transkriptase durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C und anschließendes Abkühlen auf 4°C für 5 min inaktiviert. Der Reaktionsansatz wurde mit nukleasefreiem Wasser (Eppendorf, Hamburg) auf 100 µl aufgefüllt und für weitere Anwendungen bei -20°C gelagert.

Für die PCR-Amplifikation von 16S rDNA-Fragmenten für die DGGE wurde im Wesentlichen nach den Vorgaben des Herstellers des Reverse Transkription Kits verfahren:

Es wurden für jeden PCR-Reaktionsansatz von insgesamt 100 µl abweichend vom Protokoll je 25 µl der verdünnten Reverse Transkriptase – Reaktion verwendet, 100 pmol der Primer P3 und 907r sowie 2,5 U Eppendorf Taq Master (Eppendorf, Hamburg) Taq Polymerase. Es wurde für diese PCR das weiter unten beschriebene Standard-PCR – Programm für DGGE verwendet ⁷⁶.

2.17 PCR-Amplifikation von bakterieller DNA für die Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) nach Ranjard et al. ^{74,75}

Bei der Ribosomal Intergenic Spacer Analysis handelt es sich um eine DNA – Fingerprinting Analyse, die auf einer PCR-Reaktion beruht, welche einen Bereich zwischen der 16S rDNA und der 23 s rDNA von Prokaryoten amplifiziert. Eine genaue Beschreibung der Methode ist weiter unten aufgeführt. Die Primer für diese Reaktion setzen hierbei in konservierten Bereichen der ribosomalen DNA an, der Bereich zwischen den Primern hat jedoch je nach bakterieller Gattung und Art erheblich unterschiedliche Längen. Somit wird von genomischer DNA einer gemischten Bakteriengemeinschaft ein Gemisch unterschiedlich langer PCR-Produkte enthalten.

Für die PCR nach Ranjard et al. ^{74, 75} wurden die Primer 132f (5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3') und 1522r (5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT - 3') verwendet. Die Zahlen in der Bezeichnung der Primer beziehen sich dabei auf die Position der Bindung des Primers relativ zur DNA-Sequenz der ribosomalen DNA von *E.coli*. 100 µl des PCR-Reaktionsgemisches enthielten 10 µl 10x Taq Puffer (Eppendorf), 20 µl 5x Master Enhancer (Eppendorf), 300 µM von jedem dNTP, 50 pmol jedes Primers und 2 U Taq DNA Polymerase (Eppendorf). Ungefähr 10 ng genomischer DNA wurden zu jeder Reaktion zugegeben. Die Amplifikation begann mit einem Denaturierungsschritt von 95°C für 3 min und 25 Zyklen mit jeweils 95°C für eine Minute, 53°C für eine Minute und 72°C für eine Minute. Die Reaktion wurde abgeschlossen mit einem Elongationsschritt von 5 min bei 72°C. Sämtliche PCR Reaktionen wurden in einem Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Je 10µl der PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1.4%tigen (w/v) Agarosegel nachgewiesen und mittels eines Geldokumentationssystems (Biorad) visualisiert. Die Menge des für die RISA-Gelelektrophorese verwendeten PCR-Produktes wurde dabei an die Intensität der einzelnen PCR-Produkte auf diesem Agarosegel angepasst. Die 10 µl des PCR-Produktes sollten dabei einen gut sichtbaren Bandenbereich bei hoher Intensität zeigen.

2.18 PCR-Amplifikation von bakterieller DNA für die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) nach Muyzer et al. ⁷⁶

Ebenso wie bei der RISA-Methode handelt es sich bei DGGE um eine DNA-Fingerprinting-Analyse. Bei der DGGE jedoch wird ein anderes Trennprinzip der einzelnen PCR-Produkte angewandt, was letztlich zu einer höheren Auflösung dieses ursprünglich zu Detektion von Punktmutationen entwickelten Systems führt. Genauere Details zur Wirkungsweise dieser Methode werden weiter unten beschrieben.

Im Gegensatz zur PCR für RISA werden für die DGGE Primer verwendet, die einen konservierten Bereich der 16S rDNA amplifizieren. Die Primer setzen dabei an den Positionen 314 und 907 der 16S rDNA von *E.coli* an, so dass ein PCR-Fragment von circa 590 Basenpaaren entsteht. Da nicht alle

Bereiche innerhalb der Bindestellen der Primer hochkonserviert sind, kann es durch unter anderem durch Deletionen, Insertionen und Punktmutationen zu Abweichungen kommen. Ferner liegt in dem amplifizierten Bereich ein nicht unerheblicher Unterschied der Basenpaarsequenz und somit auch des GC-Gehaltes von Art zu Art der Bakterien vor.

Der Forward-Primer für diese PCR-Reaktion ist dabei mit einer 40 bp langen GC-reichen Sequenz, einer so genannten „GC-clamp“ versehen. Diese GC-Klammer sorgt für eine sehr hohe Auflösung dieses Verfahrens, so dass sogar Punktmutationen in einem DNA-Basenpaar sichtbar gemacht werden können.

Für die PCR wurden die Primer P3 (341f + GC-Klammer) (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCC TAC GGG AGG CAG CAG – 3') und 907r (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG – 3') verwendet. Für jede Probe wurde ein Reaktionsgemisch von insgesamt 100µl angesetzt, welches 20µl Master Enhancer (Eppendorf, Hamburg), 10µl 10x Taq buffer (Eppendorf, Hamburg), 300 µmol von jedem dNTP (Perkin Elmer), 50 pmol jedes Primers (VBC Biozym, Wien, Österreich), 2 U Taq Master Polymerase (Eppendorf, Hamburg) sowie 1 µl verdünnter genomischer Proben-DNA (ca. 50 – 200 ng) bestand, eingesetzt.

Aufgrund des mit einer GC-Klammer versehenen Primers und eventueller Kontaminationen der Proben-DNA ist bei dieser PCR z.T. nur eine sehr geringe Ausbeute an PCR-Produkt zu erhalten. Bei drastischen Änderungen der Methode, zum Beispiel der Absenkung der Annealing-Temperatur sinkt jedoch gleichzeitig die Spezifität der PCR. Aus diesem Grund wurde eine „Touchdown-PCR“ verwendet. Bei diesem Verfahren wird mit variablen Annealing-Temperaturen verfahren. Eine Touchdown-PCR beginnt mit einem PCR-Zyklus mit relativ hoher Annealing-Temperatur, in den darauf folgenden Zyklen wird die Annealing-Temperatur sukzessive abgesenkt bis zu einer definierten Annealing-Temperatur, mit der die restlichen Zyklen ablaufen. Abgesehen von der Annealing-Temperatur bleiben die Temperatur für das Denaturieren und die Elongation immer konstant.

Das PCR-Programm beginnt mit einem einleitenden Denaturierungsschritt von 94°C und 5 Minuten. Diesem Schritt folgen 12 Schritte mit je 94°C und einer Minute, einem Annealing-Schritt von je einer Minute, beginnend mit 60°C, wobei diese jedoch mit jedem Schritt um 0,5°C abgesenkt wird.

Jeder dieser Zyklen endet mit einem einminütigen Elongationsschritt von 72°C. Nach diesen Schritten folgen 23 weitere Zyklen mit je 94°C und einer Minute, 55°C und einer Minute sowie 72°C und einer Minute. Diese 35 Zyklen werden abgeschlossen von einem sehr langen terminalen Elongationsschritt von 72°C und zehn Minuten. Nach diesem Schritt wird die Temperatur in jeder weiteren Minute um 1°C abgesenkt, bis eine Temperatur von 50°C erreicht ist. Mit diesem letzten Schritt wird eine Heteroduplex-Bildung von PCR-Produkten, die durch die Verwendung eines Primers mit GC-Klammer wahrscheinlich ist, unterbunden.

Die PCR-Produkte werden auf einem 1,5%igen Agarosegel bei einer Spannung von 100V mittels Elektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Geldokumentationssystem visualisiert. Analog zu der oben beschriebenen PCR für die RISA werden die Mengen der PCR-Produkte für die DGGE untereinander und an einen 100 bp – Marker angeglichen, so dass etwa 100 ng PCR – Produkt aufgetragen werden.

2.19 PCR-Amplifikation von eukaryotischer DNA für die Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) nach Diéz et al.⁷⁷

Ebenso wie andere DNA-Fingerprinting-Methoden ist die DGGE durch die Modifikation der Primer bzw. die Konstruktion spezifischer Primer auf spezielle Gruppen von Bakterien anwendbar. Hierfür werden meist DNA-Sequenzen verwendet, die für DNA-Sonden für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zur Anwendung kommen. Es werden jedoch zusätzlich jeweils GC-Klammern an die reverse primer angebracht. Nach demselben Prinzip wurden bereits Primer für die Verwendung der DGGE für Eukaryoten entwickelt. Hierbei wird ein Bereich der 18S rDNA amplifiziert und ein PCR-Produkt von circa 500 bp Länge erhalten.

Für die PCR werden die Primer EUK1a-f (5'-CTGGTTGATCCTGCCAG-3') und EUK516r-GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACCAGACTTGCCCTCC - 3') nach Diéz et al. verwendet. Der Primer EUK1a-f bindet zwischen den Positionen 4 und 20, der Primer EUK516r zwischen den Positionen 563 und 548 auf der 18S rDNA von *Saccharomyces cerevisiae*. Zur Amplifikation von DGGE-Fragmenten eukaryotischer Organismen wurden PCR-Reaktionsgemische von einem Gesamtvolumen von je 50 µl angesetzt. Jeder Reaktionsansatz enthielt 10 µl Master Enhancer (Eppendorf, Hamburg), 5 µl 10x Taq buffer (Eppendorf, Hamburg) 200 µmol von jedem dNTP (Invitrogen, Carlsbad, USA), 15 pmol von jedem Primer (VBC biozym, Wien, Österreich) sowie 2,5 U Taq Master Taq Polymerase (Eppendorf, Hamburg).

Das modifizierte PCR-Programm begann mit einem einleitenden Denaturierungsschritt von 94°C und drei Minuten, gefolgt von 35 Zyklen mit jeweils 94°C für eine Minute, 54°C für eine Minute und 68°C für zwei Minuten. Das Programm endet mit einem finalen Elongationsschritt von 68°C und sechs Minuten.

Die PCR-Produkte werden auf einem 1,5%igen Agarosegel bei einer Spannung von 100V mittels Elektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Geldokumentationssystem visualisiert. Analog zu der oben beschriebenen PCR für die DGGE werden die Mengen der PCR-Produkte für diesen Versuch untereinander und an einen 100 bp – Marker angeglichen, so dass etwa 100 ng PCR – Produkt aufgetragen werden.

2.20 Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) prokaryotischer Gemeinschaften nach Ranjard et al.^{74,75}

Bei der Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) handelt es sich um eine von zahlreichen DNA-Fingerprinting Methoden, die zur Analyse komplexer Mikrobengemeinschaften verwendet wird. Im Gegensatz zu anderen Fingerprintingmethoden, zum Beispiel SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) oder DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) werden keine Bereiche der 16S rDNA amplifiziert, sondern die Spacer-Region zwischen der 16S rDNA und der 23s rDNA. Diese ist in allen Bakterien vorhanden und kann selbst bei Bakterien derselben Gattung große Unterschiede aufweisen. Durch die Verwendung dieser speziellen Region ist die Herstellung spezifischer Primer relativ einfach, da bestimmte flankierende Bereiche der 16S und 23 s rDNA konserviert sind.

Zwei Faktoren, die mit der Verwendung der Spacer Region zwischen 16S und 23s rDNA einhergehen, sind zum einen die potenzielle Anwesenheit mehrerer rDNA-Operone. Bakterien können zwischen 1 und 11 rDNA-Operone besitzen, wobei schnell wachsende Bakterien tendenziell mehr rDNA-Operone aufweisen als langsam wachsende.

Somit kann ein und dieselbe Bakterienart durchaus mehrere Banden aufweisen, was möglicherweise zu einer Fehleinschätzung der Diversität, speziell in schnell wachsenden Gemeinschaften in einer Probe führen kann.

Für die RISA wurde das BioRad D-Code Gelelektrophorese-System (BioRad, Hercules, USA) verwendet. Es handelt sich dabei um ein Elektrophoresesystem mit 15 l Pufferreservoir, interner Heizeinrichtung und Thermostat sowie externer Spannungsquelle (BioRad, Hercules, USA). Für die Gelelektrophorese wurden 8%ige Polyacrylamid-Trenngele (QBiogene, Orangeburg, USA) (0,5x TAE-Puffer) hergestellt. Die Gele setzten sich dabei zusammen aus 6 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37:5; 40% Stammlösung; QBiogene, Orangeburg, USA), 0,3 ml 50x TAE-Puffer und 23,7 ml bidestilliertem Wasser zusammen. Die Polymerisation des Gels wurde eingeleitet durch Zugabe von 30 µl TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethan-1,2-diamin, BioRad; Herdts, Grossbritannien) und 300 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung. Auf das fertige Gel wurde ein Sammelgel mit derselben Zusammensetzung wie das Trenngel, jedoch wurde während der Polymerisation ein Kamm mit 25 Taschen hinzugefügt. Die Gele wurden zur kompletten Polymerisation 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend zur Beladung in die Gelkassette/Elektrodenhalterung der BioRad D-Code eingespannt, der Kamm entfernt sowie das Gel mit 0,5x TAE-Puffer überschichtet.

In die lateralen und die zentrale Tasche des Gels wurden 10 µl eines 100 bp Ladder – DNA-Längenmarkers (Invitrogen, Carlsbad, USA) gegeben. Zu den aufzutragenden PCR-Produkten wurde im Verhältnis 5:1 ein Ladepuffer (30% (v/v) Glycerin; 0,4% (w/v) Bromphenolblau) gegeben. Wie bereits oben beschrieben wurden die PCR-Produktmengen aneinander und an einen standardisierten 100 bp DNA-Längenmarker angepasst. Die DNA-Menge entspricht in einem solchen Marker etwa 100 ng, wobei jedoch die visuelle Intensität der Bande entscheidend ist. In der Regel wurden jedoch etwa 100 ng des PCR-Produktes für die RISA-Gelelektrophorese eingesetzt. Nach Beladung des Gels wurde eine Spannungsquelle (BioRad, Hercules, USA) angeschlossen und das Gel 16 h lang einer Spannung von 50 V bei 25°C ausgesetzt. Die Elektrophorese fand dabei in einer 0,5x TAE – Pufferlösung statt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die resultierenden Gele durch Abheben der oberen das Gel einschliessenden Glasplatte freigelegt und auf eine Plastikfolie übertragen. Jedes Gel wurde im Dunkeln mit 10 ml einer 1x SYBR Gold (Invitrogen, Carlsbad, USA) in 0,5x TAE-Puffer gefärbt und mittels eines Geldokumentationssystems aufgezeichnet sowie digital als .tif-Dateien mit einer Farbtiefe von 8 bit gespeichert.

2.21 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) prokaryotischer Gemeinschaften nach Muyzer et al.^{73, 76}

Ebenso wie RISA beruhen SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) und DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) auf der PCR-Amplifikation eines Bereiches der bakteriellen oder eukaryotischen ribosomalen DNA. Im Gegensatz zu RISA wird jedoch ein relativ konservierter Bereich der 16S / 18S rDNA amplifiziert, so dass für jeden verwendeten Primersatz ein jeweils gleich großes PCR-Produkt erzeugt wird. Im Falle des DGGE nach Muyzer handelt es sich um einen Bereich der V3 Region der 16S rDNA bei dessen Amplifikation ein etwa 590 bp langes PCR-Produkt erhalten wird.

Aufgrund des ähnlich großen PCR-Fragments, welches von allen Mitgliedern der untersuchten Gemeinschaften erzeugt wird, verwendet DGGE ein völlig anderes Trennprinzip als RISA. Für die DGGE werden PCRs mit genomischer DNA des Probenmaterials durchgeführt und die PCR-Produkte unmittelbar auf ein Polyacrylamid-Gradientengel aufgetragen. Dieses Gel enthält die denaturierenden Agentien Harnstoff und Formamid. Hierbei enthält eine 100% denaturierende Lösung per Definition 7 M Harnstoff und 40% (v/v) Formamid. Im denaturierenden Gradienten schmelzen die Doppelstränge der aufgetragenen PCR-Produkte und bilden Y-förmigen Strukturen, oder „Blasen“ und „Schleifen“. Diese Sekundärstruktur verlangsamt die Laufgeschwindigkeit der DNA-Doppelstranges in der netzartigen Struktur des Polyacrylamid-Gel.

Die DGGE-Versuche in dieser Arbeit wurden mit dem BioRad D-Code-System durchgeführt. Für die DGGE mit PCR-Produkten mariner prokaryotischer Gemeinschaften wurde ein denaturierender Gradient von 15 – 55% denaturierender Agentien verwendet. Zwei Acrylamidlösungen von 15% bzw. 55% wurden dafür durch Verdünnung einer 70% denat. Lösung mit 0% denat. Lösung erzeugt. Ein halber Liter der 70% denaturierenden Lösung enthält dabei 79 ml Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung (37,5:1; QBiogene), 5 ml 50x TAE-Puffer, 147 g Harnstoff sowie 140 ml Formamid. Alle Substanzen werden zunächst in 100 ml bidestillierten Wassers gelöst und die Lösung aufgefüllt auf 500 ml. Im Falle der 0% denat. Lösung wird auf das Formamid und den Harnstoff verzichtet.

Je 14 ml einer 15%igen und einer 55%igen Acrylamidlösung wurden mittels eines Gradientenmischers (BioRad, Hercules, USA) gemischt und zu einem Gradientengel gegossen, nachdem die Polymerisation durch Zugabe von je 11 µl TEMED (BioRad) und 78 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) eingeleitet wurde. Nach circa 60 Minuten wird ein Kamm mit 25 Taschen (BioRad) zwischen die Glasplatten geklemmt und ein Sammelgel auf das nunmehr polymerisierte Trenngel gegossen. Hierzu werden 4 µl TEMED und 34 µl 10% (w/v) APS-Lösung zu 5 ml einer 0% denat. Acrylamidlösung gegeben. Die Lösung wird mittels einer 5 ml – Präzisionspipette zwischen die Glasplatten pipettiert, so dass die Flüssigkeitsfront bündig mit den Glasplatten abschliesst. Das Gel wird eine Stunde unter einem Abzug zur Polymerisation gelagert, danach der Kamm entfernt und die Taschen mit 0,5x TAE-Puffer befüllt.

Durch eine ungleichmässige Ausbildung des denaturierenden Gradienten, kommt es häufig zu Verzerrungen („Smiling-effect“) im Verlauf des Gradienten an den Rändern der Gele, so dass die Banden nicht horizontal verlaufen. Dieser Effekt wird zwar durch Versiegelung der Spacer mit Silikon vermindert, jedoch wurden in allen Gelen die äussersten beiden Taschen nicht mit PCR-Produkten beladen. In die anliegenden Taschen sowie die zentrale Tasche wurden Marker pipettiert. Hierbei handelt es sich um zuvor ausgeschnittene, gereinigte und reamplifizierte PCR-Produkte einzelner Banden. Dabei wurden Banden verwendet, die sich über das gesamte Spektrum eines DGGE-Gradienten erstreckten verwendet. Zusätzlich wurde wegen der elementaren Bedeutung dieses Organismus eine Bande von *Alcanivorax borkumensis* in den Marker zugegeben.

Nach der vollständigen Beladung des Gels wurde dieses in eine Gelelektrophoresekammer (BioRad) in 0,5x TAE-Puffer platziert, die zuvor auf 60°C vorgewärmt wurde. Es wurde eine Spannungsquelle (BioRad) angeschlossen und die Proben bei einer Spannung von 100 V über einen Zeitraum von 16 Stunden aufgetrennt.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele entfernt und wie oben für die RISA beschrieben, gefärbt und dokumentiert.

Die dokumentierten Gele wurden auf einen DarkReader (Clare Chemicals Ltd., Dolores, USA) – einen Tisch mit Lichtquelle und Filterplatte, die speziell auf die Fluoreszenzeigenschaften von SYBR-Gold ausgelegt ist - transferiert. Banden von besonderem Interesse wurden mittels eines ethanolsterilisiertem Skalpel ausgeschnitten und für die Extraktion der enthaltenen DNA in 2 ml Eppendorf-Gefäße gegeben.

2.22 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) eukaryotischer Gemeinschaften nach Diéz et al.⁷⁷

Die DGGE von PCR-Produkten eukaryotischer Gemeinschaften wurde im Wesentlichen ebenso durchgeführt wie oben für die prokaryotischen Gemeinschaften. Es wurden Gradientengele mit Konzentrationen von 15 – 55 % denaturierender Agentien eingesetzt und auch die Elektrophoreseparameter von 100 V und 16 h beibehalten.

2.23 Extraktion und Reamplifikation von DNA aus DGGE-Polyacrylamidgelen

Zur Extraktion von DNA aus Polyacrylamidgelen, in diesem Fall den aus DGGE-Gelen ausgeschnittenen Banden, wurde eine modifizierte Methode, die auf einer DNA-Extraktion nach Sambrook und Russel basiert, verwendet^{73,78}.

Zu den ausgeschnittenen Polyacrylamidblöcken wurden je 150 µl eines sterilfiltrierten Elutionspuffers, der 0,5 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA und 0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) enthielt, gegeben und 5 Stunden bei 37°C in einem Thermomixer bei 1000 rpm inkubiert. Nach dieser Elution werden Gelstücke und Puffer in einer Tischzentrifuge bei maximaler Drehzahl und 4°C eine Minute lang zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zu den Polyacrylamidblöcken wurden je 50 µl frischen Elutionspuffers zugegeben, mittels eines Vortex gemischt und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Die Überstände wurden vereint und 400 µl reinen Ethanol zugegeben. Die DNA wurde dann durch Inkubation bei -20°C über Nacht präzipitiert. Am Folgetag wurden die Eppendorfgefäße mit den Überständen 40 Minuten lang bei 4°C und 20.000g in einer Eppendorf Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig dekantiert und Reste des Puffers mit einer Präzisionspipette entfernt. Das Pellet wurde eine bis zwei Stunden unter einer Cleanbench getrocknet. Die Verwendung einer Vakuumzentrifuge zur Trocknung ist dringend zu vermeiden, da es durch Druckunterschiede beim Stoppen und Öffnen der Zentrifuge zu Totalverlusten der Pellets kommt. Das Pellet wird in 10µl sterilen destillierten Wassers gelöst und je 1µl für die Reamplifikation der DNA verwendet.

Die Reamplifikation wird mit denselben Chemikalien und PCR-Programmen durchgeführt wie oben beschrieben. Es kommen dabei Reaktionsansätze von 50µl zum Einsatz. Es ist zu berücksichtigen, dass für Prokaryoten und Eukaryoten die korrekten oben beschriebenen Primerpaare verwendet werden.

Durch Verunreinigungen in den DGGE-Gelen, zum Beispiel Schmier von intensiven Banden im Gel, der schwächere Banden überlagert oder Kontaminationen beim Ausschneiden der Banden kommt es häufig zur Reamplifikation mehrerer Banden in einem Ansatz. Dies führt zu Problemen bei der Sequenzierung, zum Beispiel zur Chimärenbildung oder Überlagerung mehrerer Sequenzen. Um dieses Problem zu vermeiden können einzelne Banden kloniert werden. Aus diesem Grund werden extrahierte DGGE-Banden in der Regel zunächst mit Primern mit GC-Klammer reamplifiziert.

Die resultierenden PCR-Produkte werden auf ein weiteres DGGE-Gel mit einem leicht veränderten Gradienten (20 – 65% denat.) zusammen mit einem Standardmarker aufgetragen. Anhand des Standardmarkers und der ursprünglichen Gele können die korrekten ursprünglich extrahierten Banden identifiziert und ein weiteres Mal extrahiert werden.

Für Banden, deren Reinheit bestätigt ist, wird der entsprechende Extrakt für eine PCR-Amplifikation mit speziellen Primern verwendet. Da bei dieser PCR eine Sequenzierung, aber keine DGGE mehr folgen soll, werden Primer ohne GC-clamp verwendet. Es handelt sich bei den hier durchgeführten Versuchen um die Primer 341f (5'-C TAC GGG AGG CAG CAG- 3') und EUK 516a-r (5'-ACCAGACTTGCCCTCC -3') (VBC Biozym, Wien, Österreich). Diese Reamplifikation erfolgt wiederum in 50µl – Ansätzen mit denselben PCR-Reaktionsgemischen und –Chemikalien sowie PCR-Programmen wie oben beschrieben. Die PCR-Produkte werden auf einem 1,5%tigen Agarosegel bei einer Spannung von 100V mittels Elektrophorese aufgetrennt, mit Ethidumbromid gefärbt und mit einem Geldokumentationssystem visualisiert.

2.24 Klonierung von extrahierter DNA aus DGGE-Banden

Wie oben beschrieben besteht eines der Probleme bei der direkten Bandenextraktion aus Fingerprinting-Gelen in der Kontamination der ausgeschnittenen Banden. Um besonders wichtige kontaminierte Sequenzen aufzureinigen ist es daher nötig, die DNA-Sequenzen zu vereinzeln und zu sequenzieren. Dies kann experimentell durch Klonierung und Expression in *E.coli* erreicht werden. Für die DNA-Sequenzen, die in den oben beschriebenen Experimenten nicht komplett aufgereinigt werden konnten, wurde wie oben beschrieben eine Reamplifikation mit Primern ohne GC-Klammer durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%tigen Agarosegel durch Elektrophorese bei 100V für 30 min überprüft und mittels des QiaQuick PCR-Reinigungs-Kits (Qiagen, Hilden) durch Auftragen, Zentrifugation, Waschen und Elution des PCR-Produkts auf Gelsäulen nach Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Etwa 20 ng des PCR-Produktes wurden für eine Ligationsreaktion in einen Expressionsvektor genutzt. Hierzu wurde das TOPO-Kloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Das PCR-Produkt wurde zu 1 µl TOPO TA pCR 2.1-Vektor-Lösung und 2 µl eines Puffers gegeben. Die Ligationsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min.

Nach Abschluss der Ligation wurde der Reaktionsansatz aufgefüllt auf 50 µl und 450 µl n-Butanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) zugegeben. Dieser Reinigungsansatz wurde mittels eines Vortex gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um sämtliche Nukleinsäuren auszufällen. Durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei maximaler Drehzahl für 10 Minuten wurde das Präzipitat gesammelt. Das überschüssige Butanol-Wasser-Gemisch wurde mittels einer Präzisionspipette entfernt und das Pellet 30 min in einer Vakuumzentrifuge (Savant) getrocknet und in 4 µl sterilem MilliQ-Wasser resuspendiert.

Zwei Microliter dieser Lösung wurde zu 10 µl One Shot TOP 10 – Zellsuspension von *E.coli* (Invitrogen, Carlsbad, USA) gegeben, vermischt und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (PeqLab) gefüllt. Die Transformation der Zellen wurde mit einem Gene Pulser – Elektroporator (BioRad, Hercules, USA) bei 1,8 kV für 4 ms durchgeführt. Die Zellen wurden unmittelbar nach der Elektroporation mit 250 µl auf 37°C vorgewärmtem SOC-Medium aufgefüllt und 1 h bei 37°C in einem Thermomixer unter Schütteln inkubiert.

Je 50 µl jedes Klonierungsansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit 50 mg/l Kanamycin und 50 mg/l X-Gal für eine Blau/Weiss-Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je drei bis fünf weisse Kolonien wurden in 10 µl sterilen MilliQ-Wassers resuspendiert, 5 min bei 96°C gekocht und je 2µl für eine wie oben beschriebene PCR von je 20µl Gesamtvolumen mit den durch das TOPO-TA-Kit gelieferten Primern M13 und M13r nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden mittels Gelelektrophorese wie bereits beschrieben überprüft und je 1 µl jeder Reaktion wie unten beschrieben für die Sequenzierung nach Sanger eingesetzt.

2.25 Sequenzierung von DGGE-Fragmenten der 16S rDNA nach Sanger

Für die Sequenzierung nach Sanger wurde das Big Dye Terminator Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. In diesem Kit wird ein so genannter „Premix“ verwendet, der Polymerase und ein optimiertes Gemisch aus Desoxy- und Didesoxynukleotiden enthält. Die Sequenzierungsreaktionsansätze wurden auf ein Gesamtvolumen von je 10 µl ausgelegt. Dabei wurden 2 µl des Big Dye Premix, 1 µl eines 10x Sequencing Buffers und 0,5 µl (30 pmol) je eines der für die DGGE-PCR eingesetzten Primer verwendet. Zu jedem Ansatz wurde je 1 µl des oben beschriebenen aufgereinigten PCR-Produktes der DGGE-Banden eingesetzt. Da die Sequenzierungsreaktions sehr empfindlich auf Kontaminationen durch Pufferreagentien und vor allem Nukleotide reagiert, wurden sämtliche eingesetzten Templates zuvor mittels des Quiaquick-Kits in Form von Gelsäulen oder Gelreinigungsplatten im 96-Lochplatten-Format nach Vorgaben des Herstellers gereinigt werden.

Die Sequenzierreaktion wurde in einem Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Dabei begann die Reaktion mit einem Denaturierungsschritt von 3 Minuten und 94°C, gefolgt von 35 Zyklen von je einer Minute bei 94°C und vier Minuten bei 50°C.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Big Dye Terminator Kits entweder in 96-Loch-Platten oder in Form von Säulen nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Im Fall der 96-Loch-Platten wurden die PCR-Produkte mittels eines Vakuumpumpenadapters (Qiagen, Hilden) und einer Unterdruckpumpe (Millipore) auf die Gelsäulen transferiert und danach eluiert, während im Falle der Gelsäulen eine Eppendorf Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zum Einsatz kam. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in 96-Lochplatten (Abigene, Applied Biosystems, Foster City, USA) transferiert und mittels einer Savant Vakuumzentrifuge (GMI, Ramsey, USA) getrocknet.

Das getrocknete Pellet wird in Formamid resuspendiert und mittels eines automatischen Perkin Elmer DNA-Kapillarsequenzierers (Applied Biosystems, Foster City, USA) analysiert. Die resultierenden Chromatogramme wurden wie unten beschrieben ausgewertet.

2.26 Statistische Analyse der RISA-Fingerprintmuster und Multidimensional Scaling Analysis

Im Laufe der Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften mittels RISA wurden zwischen 250 und 300 DNA-Fingerprints erhalten. Um diese Anzahl von Muster zu analysieren, wurde eine computergestützte statistische Analyse durchgeführt. Hierbei kam das Programm Bionumerics Gelcompare (Applied Maths, Sint-Martens-Latern, Belgien) zum Einsatz. Diese Software verfügt über eine Anzahl von Subroutinen, die digitale Aufzeichnungen von Polyacrylamid-Gelen in Form von .tif-Dateien analysieren kann.

Da sich aufgrund der Polymerisation des Polyacrylamidgels Verzerrungen oder unterschiedliche Lauflängen der Banden ergeben können, sind RISA-Gele niemals absolut deckungsgleich; daher müssen die einzelnen Gele aneinander angeglichen werden. Das Programm Bionumerics verfügt hierfür über eine Subroutine, die durch Vorgabe der Spuren, der Position der Marker sowie einzelner in allen Gelen vorhandenen Banden, die Gelen entzerren und aneinander angleichen kann. Hierzu werden dem Programm zunächst die Lage der einzelnen Spuren und die einzelnen Banden der Marker vorgegeben. Die Subroutine korrigierte und entzernte anhand der Vorgaben die einzelnen Gele und kalkulierte die Größe und Position aller anderen Banden im Gel. Die Bandenmuster aller Spuren wurden durch das Programm mittels einer Band-Matching-Subroutine analysiert. Diese Subroutine kontrolliert unter der Vorgabe, dass zwei Banden, die im Gel während der Elektrophorese gleich weit transportiert werden, demselben Organismus zuzuordnen sind, die Spuren und ordnet die Banden nach ihrer Position zu Banden-„Klassen“.

Nachdem die Längen und Position aller DNA-Fragmente in den Banden bekannt war, wurde eine densitometrische Analyse⁷⁹ der einzelnen markierten Spuren durchgeführt, bei der die Bandenmuster entsprechend ihrer Intensität als densitometrischen Kurven dargestellt wurden.

Aus den Werten des Band-Matchings, des Längenabgleichs mit dem 100bp-Markern und der densitometrischen Kurve wurde durch die Bionumerics-Software eine Matrix berechnet, die sowohl Intensität als auch Lage der Bande und somit Länge des DNA-Fragments beinhaltet. Hierfür wurde der Bray-Curtis-Index unter Verwendung einer square root transformation^{80, 81} eingesetzt, um die Ähnlichkeiten der einzelnen Muster untereinander und zum gesamten Datensatz zu berechnen.

Die in der resultierenden Matrix erhaltenen Indices wurden für eine Multidimensional Scaling Analysis (MDS) durch das Programm Primer 5^{80,81} verwendet. Diese Art der Analyse ermöglicht eine zwei- oder dreidimensionale Darstellung der einzelnen Muster als Punkte auf einer Fläche bzw. in einem Raum. Anhand der Bray-Curtis-Indices wird jedem Muster eine definierte Position im Diagramm zugeordnet. Analog zu einem phylogenetischen Baum für DNA-Sequenzen sind sich zwei Punkte im Diagramm umso näher, desto ähnlicher sind sich die Bandenmuster. Für die Darstellung in dieser Arbeit wurde eine zweidimensionale Darstellung der MDS-Grafiken gewählt. Diese ist aufgrund der Vielzahl an Bandenmustern weniger zuverlässig, jedoch werden dreidimensionale Darstellungen oder eine zweidimensionale Abbilder dieser durch die Wahl eines Betrachtungswinkels verzerrt. Die Darstellung der Matrix mittels MDS bietet die Möglichkeit, bestimmte Daten jedes Bandenmusters, beispielsweise den Faktor Nährstoffzugabe, mit der Darstellung zu verknüpfen. In den MDS-Diagrammen werden darauf alle Punkte, die den Bandenmustern aus nährstoffversorgten Mikrokosmen entsprechen, markiert.

2.27 Erstellung phylogenetischer Bäume mittels Phylip 3.5 und Mega 4.0

Für die Auswertung der durch die Sequenzierung erhaltenen Chromatogramme wurde eine Reihe von Computerprogrammen verwendet. Die Daten der DNA-Sequenzen werden durch die Auswertungssoftware als Chromatogramme dargestellt und automatisch in DNA-Basenpaarsequenzen konvertiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden gegebenenfalls manuell korrigiert und mittels des Programms BioEdit⁸² visualisiert und in Form von .fasta-Dateien gespeichert. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass zu jeder der oben erwähnten sequenzierten DNA-Sequenzen beide Stränge der DNA sequenziert werden.

Methodisch bedingt sind jeweils die Anfangs- und die Endbereiche der Sequenzen von schlechter Qualität, da statistisch gesehen durch das Kettenabbruchverfahren nach Sanger viele kurze aber nur wenige lange Abschnitte der DNA kopiert werden. Um diesen Nachteil auszugleichen wurde ein Programm eingesetzt, welches die Sequenzen beider DNA-Stränge übereinanderlegt, miteinander abgleicht und mögliche Fehler in den Endbereichen beider Sequenzen korrigiert. Dieser als Sequence Assembly bezeichnete Prozess wird durch die Subroutine CAP („contig assembly program“) des Programms BioEdit durchgeführt.⁸²

Einzelne so verrechnete Sequenzen wurden mittels des Programms BLASTn⁸³ mit der Gesamtheit der in der Datenbank GenBank auf der NCBI-Internet-Website (www.ncbi.nlm.nih.gov) hinterlegten DNA-Sequenzen verglichen. Diejenigen publizierten Sequenzen der Datenbank aus den Organismen mit validierten Namen laut DSMZ Bacterial Nomenclature resource (<http://www.dsmz.de/microorganisms>) der Datenbank, welche der eingegebenen Sequenz am ähnlichsten sind, werden kopiert und ebenfalls in die oben beschriebene .fas-Datei eingefügt. Ebenso werden der dazugehörige Organismus sowie die Sequenzähnlichkeit in Prozent zu jeder eingegebenen Sequenz in eine Tabelle eingetragen.

Abschließend werden zusätzlich die 16S rDNA- Sequenzen einiger taxonomisch oder funktionell relevanter Organismen in die neu generierte Datenbank eingefügt. Um die Sequenzen anhand ihrer Basenabfolge aneinander anzugleichen („Sequence alignment“) wurde die Datenbank in das Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) eingespeist. Dieses Programm untersucht die Gesamtheit aller Sequenzen und verschiebt ihre Basenpaarabfolgen so, dass sie parallel zueinander liegen. Da sich die vollständigen Basenpaarsequenzen innerhalb der Datenbank z.T. deutlich unterscheiden, wurden alle DNA-Sequenzen auf die Länge der kürzesten Sequenzen – hierbei handelte es sich um die Sequenzen der extrahierten DGGE-Banden gekürzt. Nach einem weiteren Sequence Alignment mittels Clustal W wurde die resultierende Datenbank mittels zweier unterschiedlicher Programme weiterführenden Analysen unterzogen.

Zum einen kam das Programm Phylip 3.5 zum Einsatz (<http://www.evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.)¹⁴⁷. Zur Konstruktion aussagekräftiger phylogenetischer Bäume wurden nacheinander die Subroutinen „seqboot“, „dnadist“ und „fitch“ verwendet, indem die von jeder Subroutine berechneten Daten in die folgende eingesetzt wird⁸⁴. Ein repräsentativer phylogenetischer Baum zu jedem der eingegebenen Datensätze wurde mittels der Subroutine „consense“ berechnet und mit dem Programm „Treeview“ (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) visualisiert. Der resultierende phylogenetische Baum wurde im .wmf – Format exportiert.

Das Programm MEGA 4 (Molecular Evolution Genetics Analysis, Tamura et al.) (<http://www.megasoftware.net>)⁸⁵ führt im Wesentlichen dieselben Berechnungen durch wie das Programm Phylip, ist jedoch zu einem großen Teil automatisiert. Es wird eine Anzahl an Sequenzdaten in Form einer .fas – Datei eingespeist und diese unter Verwendung derselben Berechnungsparameter automatisch zu einem phylogenetischen Baum mit „bootstraps values“ umgerechnet. Ein Vergleich eines Datensatzes, der sowohl mit Phylip als auch mit MEGA 4 einer phylogenetischen Analyse unterzogen wurde zeigte in beiden Fällen nahezu deckungsgleiche phylogenetische Bäume.

2.28 Gaschromatographische Analysen von Öl und Ölrückständen

Ein indirekter Nachweis der Aktivität ölabbauender Mikroorganismen in Verbindung mit einer hohen Respirationsrate und bakteriellem Wachstum ist das Verschwinden von Öl oder Ölbestandteilen aus den Versuchssystemen. Es ist darüber hinaus der entscheidende Faktor jeder auf den Abbau von Ölverschmutzungen ausgerichteten biotechnologischen oder industriellen Forschung.

In Bezug auf die Aktivität von ölabbauenden Mikroorganismen muss ein Standard zugefügt werden, der von Mikroorganismen nicht oder nur sehr schwer abbaubar ist. In der Fachliteratur sind die Kohlenwasserstoffe Hopan, Phytan, Pristan und Squalen als solche aufgeführt. Es handelt sich dabei um verzweigte ungesättigte Kohlenwasserstoffe, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur nur sehr schwer von mikrobiellen Enzymen, zum Beispiel Mono- oder Dioxygenasen angegriffen werden können. Für sämtliche Versuche wurde Squalen aufgrund der einfachen Verfügbarkeit eingesetzt. Mangels vorhandener Chromatographen, Chromatographiesäulen und Erfahrungswerten wurde lediglich die Extraktion der Kohlenwasserstoffe durchgeführt. Das Probenmaterial wurde dann an spezialisierte Labore weitergeleitet. Bedingt durch die Versuchsbedingungen wurden unterschiedliche Extraktionen durchgeführt, während die Gaschromatographie im Wesentlichen nach den Vorgaben von Dutta et al.⁸⁶ durchgeführt wurden.

Im Falle der unter 1.1. beschriebenen Mikrokosmen wurden entweder ölkontaminierte Bestandteile des Ölbindemittels oder Rückstände des ungebundenen Bunker C-Schweröls entnommen. Etwa ein Gramm Ölrückstand oder Bindemittel wurde in 50 ml n-Pentan (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) resuspendiert und in 50 ml – PP-Röhrchen umgefüllt. Die Röhrchen wurden über Nacht mittels eines Evaporators unter dem Abzug inkubiert. Die Rückstände wurden an Dr. Michail Yakimov an das Istituto Sperimentale Talassografico, Messina, Italien, verschickt und nach Dutta et al. analysiert⁸⁶.

Für eine Analyse von Ölrückständen aus den Mesokosmenversuchen wurden sowohl ölkontaminiertes Ölbindemittel als auch jeweils 500 ml Mikrokosmenflüssigkeit, die emulgiertes Schweröl in unterschiedlicher Konzentration enthielt, entnommen, in 500 ml Braunglasflaschen umgefüllt und bei -20°C gelagert. Nach Entnahme aller Proben wurden diese gekühlt versendet an die Firma LUA-Labor für Umweltanalytik, Schwerin. Sowohl Extraktion als auch gaschromatographische Analyse wurden durch diese Firma durchgeführt.

Die Untersuchung von Ölrückständen aus den unter 1.3 beschriebenen Protozoenfrassversuchen wurde durch Dr. Manfred Nimtz vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung durchgeführt. Hierzu wurde aus den oben beschriebenen Mikrokosmen nach Abschluss der Versuche das gesamte Ölbindemittel entfernt. Die jeweils 5 g Ölbindemittel wurden in 100ml Glasflaschen (Schott) gefüllt und 100 ml Cyclohexan (Roth) zugegeben. Die Flaschen wurden verschlossen und 48 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Resultierende Extrakte wurden in 50 ml – PP-Röhrchen transferiert, und mit Cyclohexan verdünnt. Die Analyse erfolgte wie oben beschrieben mittels eines ThermoFinnigan GCQ – Massenspektrometers (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)⁸⁶. Die Messungen wurden dabei bei Temperaturen von 80°C bis 340°C bei einer Temperatursteigerung von 10°C pro Minute durchgeführt.

2.29 Quantifizierung kultivierbarer ölabbauender mariner Mikroorganismen mittels MPN (Most probable number) – Methode und Sheen screen ⁸⁸

Eine klassische Methode zur quantitativen Bestimmung der Abbauleistung von Schadstoffen durch eine mikrobielle Gemeinschaft ist die MPN-Methode, bei der durch serielle Verdünnung einer Umweltprobe und anschließende Bebrütung der Verdünnungsreihe auf selektiven Nährböden die Gesamtzahl aller kultivierbaren Bakterien ermittelt wird.

Obwohl MPN-Methoden nur kultivierbare Organismen nachweisen können, sind sie doch für den hier verwendeten biotechnologischen Versuchsansatz durchaus relevant, da bei der Bioaugmentation die Lebensfähigkeit der eingebrachten Bakterien von eminentem Interesse ist.

Für die MPN-Methode wurden sowohl ONR7a-Flüssigmedium als auch –Agar ⁶⁵ hergestellt. Verdünnungsreihen wurden in sterilen 96 – Lochplatten angesetzt, indem in jedes Loch der Platte 235 µl ONR7a-Medium gefüllt wurden. Durch Zugabe von 25 µl der ursprünglichen Probe zu in das erste Loch und sukzessive Verdünnung dieser durch Transfer von jeweils 25 µl Verdünnung aus einem Loch in das nächstliegende wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen in fallender Reihe hergestellt. 100 µl jeder Verdünnung wurden jeweils auf eine ONR 7a – Agarplatte ausplattiert. In den Deckel jeder Platte wurde ein autoklaviertes Filterplättchen von 5x5 mm Filterpapier (Whatman) gelegt und mittels einer Pasteurpipette je ein Tropfen auf 100°C vorgeheiztes Bunker C – Schweröl auf das Plättchen gegeben. Die Platten wurden zehn Tage lang bei Raumtemperatur bebrütet und danach die Koloniezahlen bestimmt.

Parallel zur MPN-Methode wurde ein „Sheen screen“-Test zur Bestimmung der Aktivität ölabbauender Mikroorganismen verwendet. Ein sicheres Indiz dieser Aktivität ist die Emulsionsbildung des Öls. Im Wesentlichen handelt es sich bei der hier verwendeten „Sheen screen“-Methode um eine Modifikation der MPN-Methode ⁸⁸: Auch hier werden Verdünnungsreihen angesetzt und in 24 – Lochplatten pipettiert. Im Gegensatz zur MPN-Methode auf Agarplatten werden jedoch keine absoluten Zellzahlen anhand von Koloniezahlen bestimmt, sondern die höchste Verdünnung, bei der ein bestimmter Effekt – in diesem Fall die Emulsifikation von Öl im wässrigen Medium – auftritt. Anhand dieser höchsten Verdünnung wird die Zahl der emulgierenden bzw. tensidproduzierenden Bakterien bestimmt.

Hierfür wurde steriles Bushnell-Haas-Flüssigmedium hergestellt. Für die Verdünnungsreihen wurden sterile 24 – Loch-Zellkulturplatten (Nunc) verwendet. Für jede Verdünnungsstufe wurden drei Löcher mit je 1,8 ml Bushnell-Haas-Flüssigmedium befüllt. Je 200 µl der Probenlösung wurden in die ersten drei gefüllten Löcher der 24-Lochplatte gegeben, um die Verdünnungsstufe 10⁻¹ zu erhalten. Durch sukzessiven Transfer weiterer 200µl in die jeweiligen folgenden Löcher wurde eine Verdünnungsreihe bis zur Stufe 10⁻⁹ hergestellt. Auf die Oberfläche jedes befüllten Loches wurde mittels einer Pasteurpipette ein Tropfen zuvor auf 100°C erhitzten Bunker C-Schweröls gegeben. Die so befüllten und inokulierten Platten wurden mit Parafilm versiegelt und 14 Tage bei 20°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte wie im Falle einer MPN-Methode.

3 Ergebnisse

3.1 Mikrokosmenstudie - Allgemeine Beobachtungen

Die für die Bestimmung von Rahmenparametern des mikrobiellen Abbaus von Öl im Meer eingesetzten Mikrokosmen zeigten bereits innerhalb weniger Tage ein sehr unterschiedliches Verhalten. Das auffälligste Merkmal war dabei eine intensive Schwarzfärbung in allen Mikrokosmen, die mit der Düngerlösung nach Gunkel behandelt wurden und Bunker C – Schweröl enthielten (Mikrokosmen 3, 5, 7, 15, 17, 19, 21, 23, 25). Das Auftreten der Färbung trat dabei in beiden Parallelansätzen jeweils gleichzeitig oder mit wenigen Tagen Abstand auf. Dabei konnte eine zeitliche Staffelung abhängig vom Versuchsansatz beobachtet werden. Im Falle des Ansatzes 7 konnte eine starke Schwarzfärbung nach bereits sechs Tagen beobachtet werden, wenige Tage später trat diese in den Ansätzen 3 und 5 auf. Nach etwa 14 Tagen wurde dieses Phänomen in den Ansätzen 21, 23 und 25, nach 21 Tagen in den Ansätzen 15, 17 und 19 sichtbar. Eine genauere Betrachtung der Mikrokosmen zeigte eine enorme Anzahl von schwarzen unregelmässig geformten Flocken von 0,2 – 1 mm Länge bzw. Durchmesser. Diese Flocken waren im Falle der Ansätze 3, 5 und 7 größer als in den übrigen Ansätzen. Auch war die Konzentration dieser Flocken im Falle der genannten Mikrokosmen dichter. Mikroskopische Betrachtung und Filtration der Mikrokosmenflüssigkeit zeigten, dass die schwarzen Flocken zu einem großen Teil aus Öl bestanden, es handelte sich dabei also um eine Öl-in-Wasser-Emulsion des Bunker C – Schweröls.

Die Abbildung 3.1a-c zeigt die Verteilung der Emulsionsbildung über die Mikrokosmen nach zwei, vier und sechs Wochen; besonders auffällig ist der Kontrast zwischen Ansätzen mit und ohne Zugabe von Nährstoffen. Eine weitere Beobachtung ist das Absinken des Ölbindemittels in einigen Fällen. Dies geschieht durch eine Aufnahme von Wasser durch das gebundene Öl. Öl und Ölbindemittel verlieren durch denselben Prozess den Auftrieb und sinken zum Boden der Mikrokosmen. Im Experiment wurde dies hauptsächlich für aus Altschuh hergestellten X-Oil beobachtet. Dennoch war die Bildung einer Emulsion auch in Ansätzen zu beobachten, die Ölbindemittel enthielten. In einigen Fällen, zum Beispiel in den Ansätzen 23 und 25 trat die Emulsionsbildung sogar in Anwesenheit von Ölbindemittel einige Tage eher auf als in dessen Abwesenheit.

Bei Abschluss der Versuchsreihe konnte in den Ansätzen 3, 5, 7 und 17 ein Rückgang der Schwarzfärbung und somit der Menge an emulgiertem Öl beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war in allen Ansätzen ohne Nährstoffzugabe sowie in den Kontrollmikrokosmen keine Veränderung des als Ölteppich oder an Bindemittel gebundenen Bunker C – Schweröls zu beobachten.

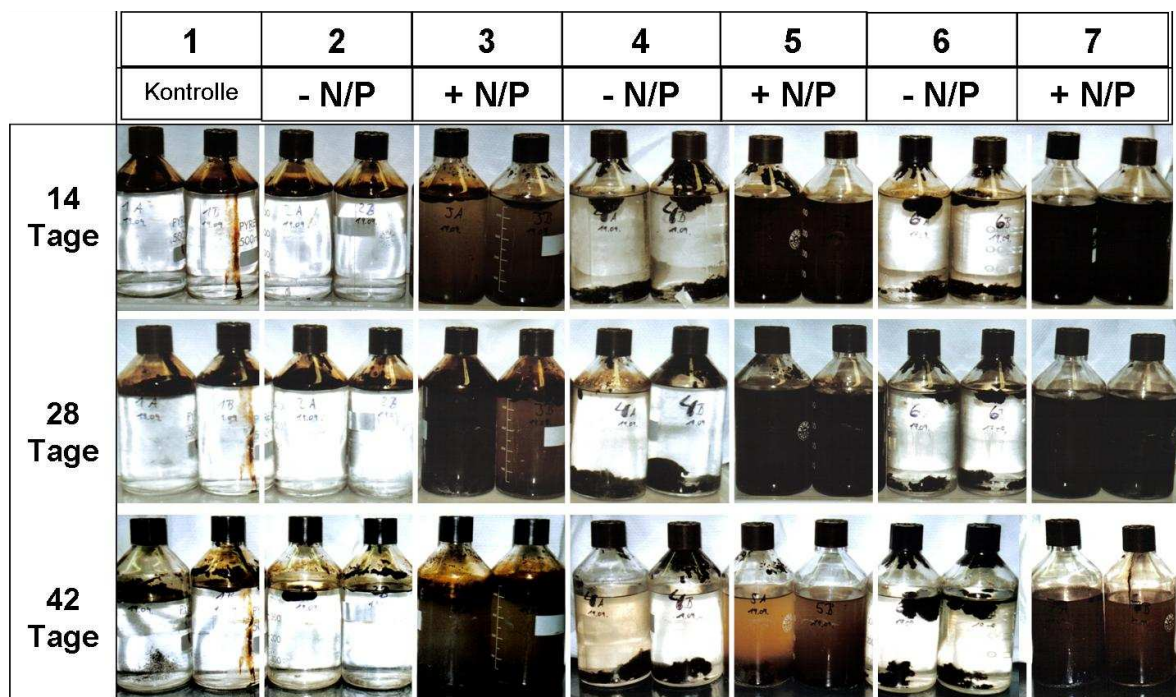


Abb. 3.1a: Emulsionsbildung in den Mikrokosmen 1 – 7 nach 14, 28 und 42 Tagen. Zahlen über den Abbildungen geben die Codierung der einzelnen Mikrokosmen an. Die Zusammensetzung der einzelnen Mikrokosmen ist in Tabelle 2.I angegeben. Das Symbol -/+ N/P gibt die Zugabe von Nährstoffen nach Gunkel an⁷⁰. Bei Mikrokosmos 1 handelt es sich um eine Sterilkontrolle. Die Mikrokosmen 8 – 13 enthalten Kontrollen ohne Zugabe von Bunker C – Schweröl, sind aber mangels Veränderungen und mikrobieller Aktivität über den Versuchsablauf nicht photographisch festgehalten worden.

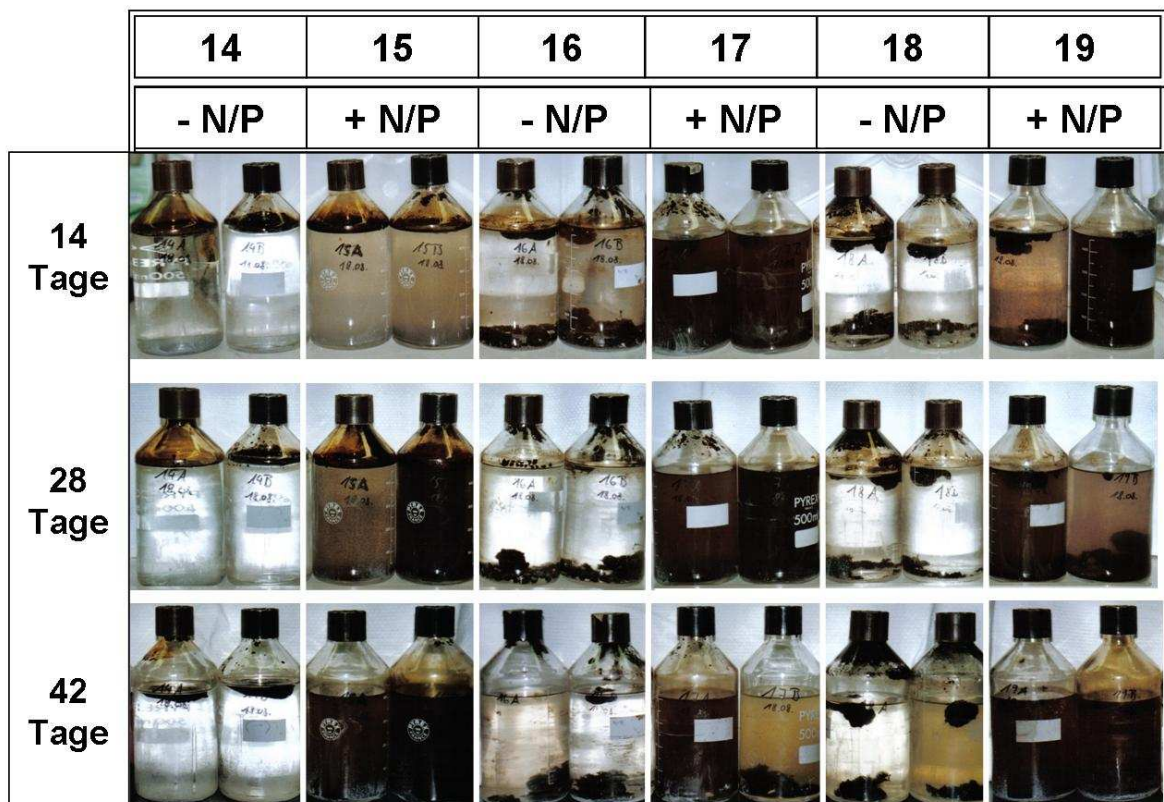


Abb. 3.1b: Emulsionsbildung in den Mikrokosmen 14 – 19 nach 14, 28 und 42 Tagen. Zahlen über den Abbildungen geben die Codierung der einzelnen Mikrokosmen an. Die Zusammensetzung der einzelnen Mikrokosmen ist in Tabelle 2.I angegeben. Das Symbol -/+ N/P gibt die Zugabe von Nährstoffen nach Gunkel an⁷⁰. Bei Mikrokosmos 1 handelt es sich um eine Sterilkontrolle. Im Falle des Ansatzes 19 wurden bei der Photographie nach 14 und 28 Tagen die beiden Parallelen vertauscht.

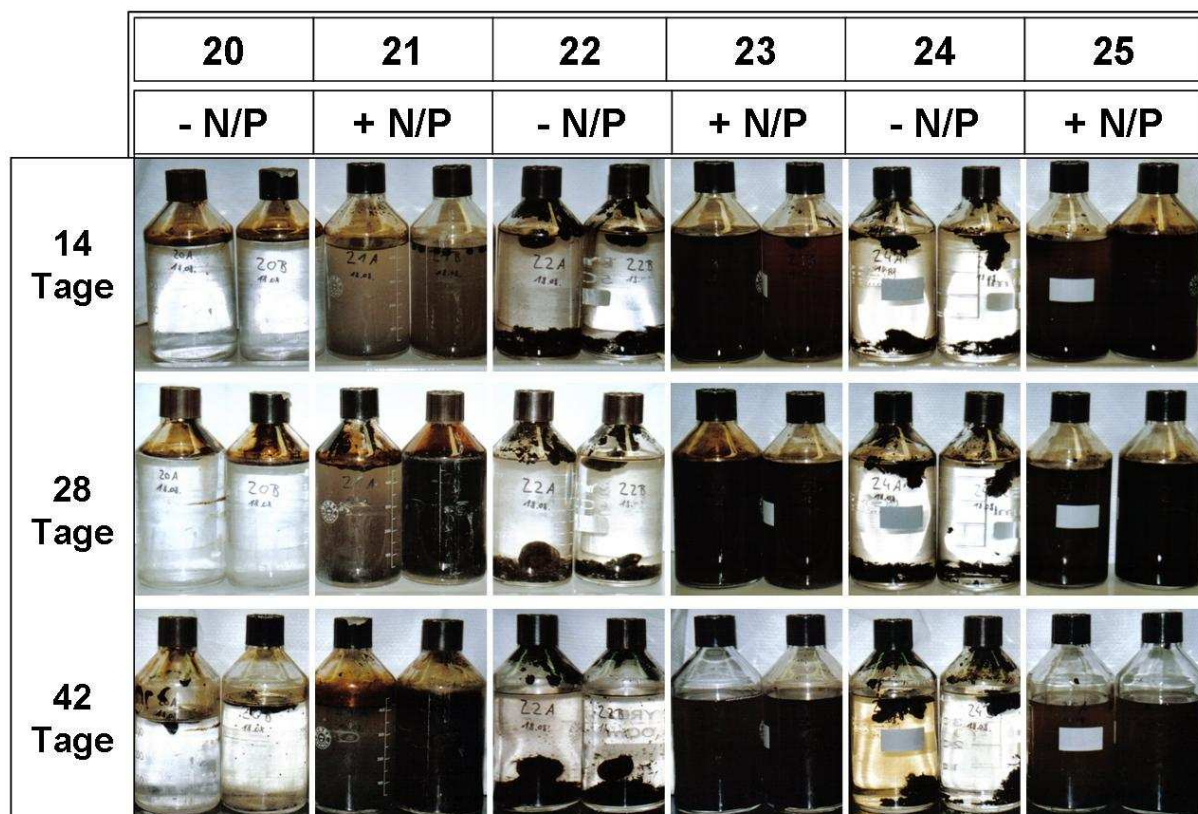


Abb. 3.1c: Emulsionsbildung in den Mikrokosmen 20 – 25 nach 14, 28 und 42 Tagen. Zahlen über den Abbildungen geben die Codierung der einzelnen Mikrokosmen an. Die Zusammensetzung der einzelnen Mikrokosmen ist in Tabelle 2.I angegeben. Das Symbol -/+ N/P gibt die Zugabe von Nährstoffen nach Gunkel an⁷⁰. Bei Mikrokosmos 1 handelt es sich um eine Sterilkontrolle.

3.2 Mikrokosmenstudie - Mikroskopische Beobachtungen

Infolge der Emulsionsbildung in den Mikrokosmen wurden intensive mikroskopische Beobachtungen der Mikrokosmen durchgeführt. Hierbei wurden die oben beschriebenen Aggregate mikroskopisch untersucht. Abb. 3.2e zeigt die besagten Aggregate aus einer Probe, die 14 Tage nach Versuchsbeginn aus Mikrokosmos 15 entnommen wurde, bei einer 100fachen Vergrößerung. Die erkennbare dunkle, unregelmäßige Struktur hat eine Länge von mehr als 500 µm und eine variable Breite. Farbe und Löslichkeitsverhalten deuten darauf hin, dass sich das Innere der Struktur aus Bunker C - Öl zusammensetzt. Die Dunkelfeldmikroskopie zeigt hierbei einen hellen Bewuchs des Öls. Da das Öl offensichtlich im Wasser in Lösung gegangen ist, handelt es bei der Mikrokosmenflüssigkeit um eine Öl-in-Wasser-Emulsion. Im Laufe des Versuches werden die großen Strukturen - wie in Abb. 3.2d erkennbar – zu kleinen Micellen umgesetzt. Die hierfür verwendete Probe wurde ebenfalls aus Mikrokosmos 15, jedoch vier Wochen nach Versuchsbeginn, entnommen. Es ist eine Vielzahl von Öltröpfchen mit einem Durchmesser von 2 – 10 µm zu erkennen. Dieser Prozess konnte in derselben Form in allen weiteren mit Nährstoffen behandelten Mikrokosmen beobachtet werden, wobei dieser wie bereits oben beschrieben zu unterschiedlichen Zeitpunkten beginnt.

Die Betrachtung der oben beschriebenen Öltröpfchen bei 1000facher Vergrößerung zeigte dabei, dass die Emulsionsbildung mit der Anwesenheit von Bakterien korreliert. Die Abb. 3.2a zeigt einen Öltröpfchen aus Mikrokosmos 7 nach etwa zehn Tagen Versuchsdauer. Es sind deutlich kurze, stäbchenförmige Bakterien an der Oberfläche des Öltröpfchens zu erkennen, die in großer Zahl und z.T. in mehreren Lagen wachsen. Mit fortschreitender Versuchsdauer wurden wie in Abb. 3.2b dichte Schichten von biologischem Material sowie Bakterien auf den Oberflächen des Öls beobachtet. Eine Bildung solcher Biofilme war dabei nicht nur in der Mikrokosmenflüssigkeit, sondern auch auf der Oberfläche des Ölbindemittels X-Oil zu beobachten. Wie Abbildung 3.2c deutlich zu erkennen ist, sind auf den Textilfasern, welche die extrem große Oberfläche des Ölbindemittels bilden, Öltröpfchen mit unterschiedlichem Durchmesser zu erkennen, die von einer im Phasenkontrast hellen, also relativ dichten Schicht eines Biofilms umschlossen sind. Die Tatsache, dass selbst an das Ölbindemittel gebundenes Öl durch Bakterien bewachsen wird, erklärt die Emulsionsbildung in den Mikrokosmen, welche mit X-Oil behandelt wurden. Jedoch deutet die Ablösung des Öls vom Ölbindemittel an, dass die hydrophobe Wechselwirkung von Bindemittel und Öl unterbrochen wurde, zum Beispiel durch oberflächwirksame Substanzen wie Tenside.

Diese massive Bildung von Emulsionen und Biofilmen tritt somit abhängig von der Versorgung mit Nährstoffen zusammen mikrobieller Aktivität an der Oberfläche des Öls auf.

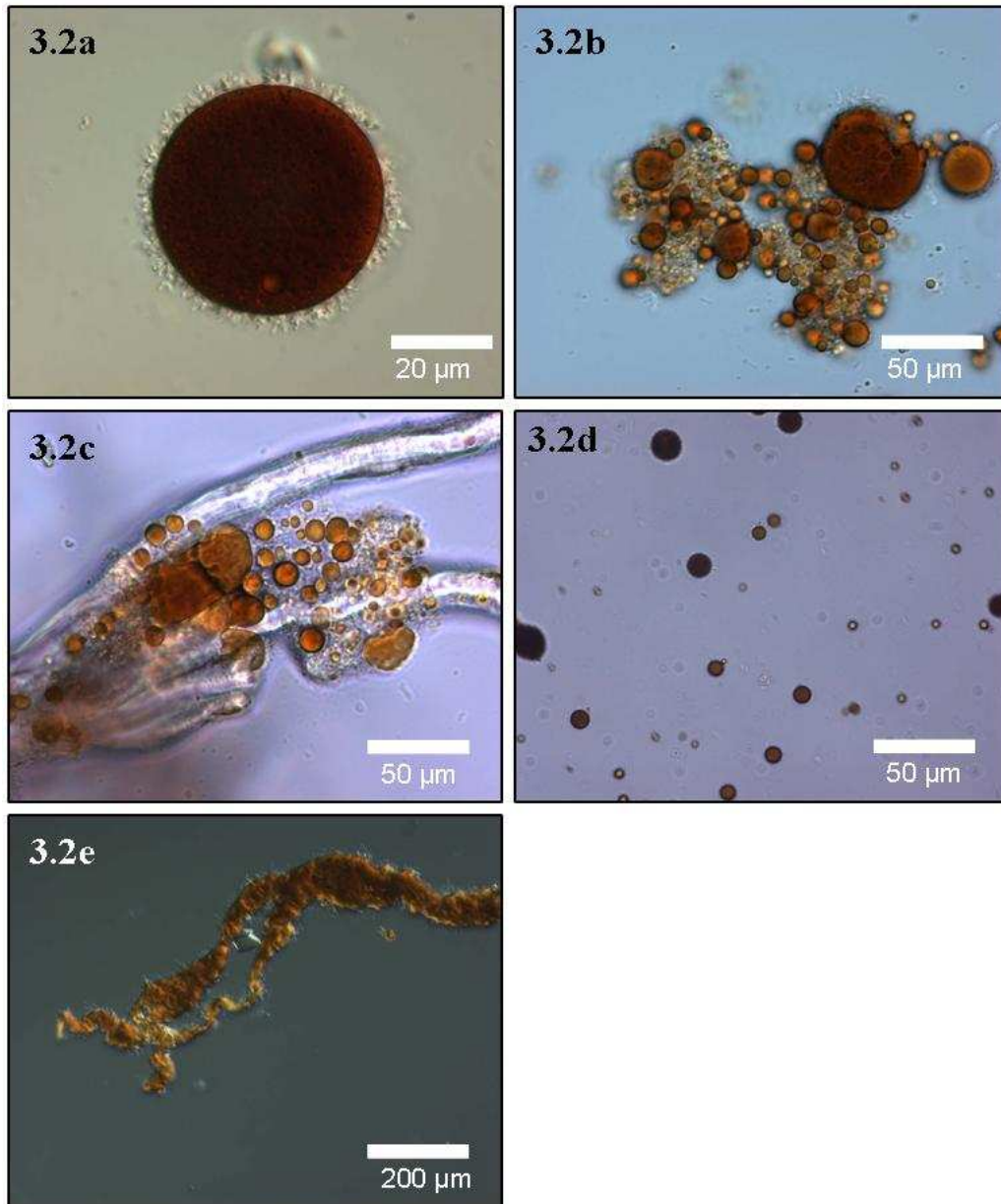


Abb. 3.2 a – e: Sämtliche Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axioskop und der Software AxioCam unter Verwendung verschiedener Methoden und Objektive durchgeführt

- Oben links: Abb. 3.2a: Öltröpfchen bzw. Micelle von Bunker C – Schweröl, bewachsen durch Bakterien; Phasenkontrastobjektiv, 1000fache Vergrößerung
- Oben rechts: Abb. 3.2b: Öltröpfchen bzw. Micellen, teilweise umschlossen von Biofilmen; dichter Bewuchs von Bakterien am oberen Rand der großen Micelle; Phasenkontrastobjektiv, 400fache Vergrößerung
- Mitte links: Abb. 3.2c: Biofilm auf der Oberfläche von Schweröl, welches an Fasern des Ölbindemittels X-Oil (helle, längliche Strukturen vom unteren rechten zum oberen linken Bildrand) gebunden ist; die große zentrale Micelle ist noch an das Ölbindemittel gebunden, während andere Teile des Öls wie in 3.2b zu sehen in kleine Micellen aufgespalten und durch Biofilme umschlossen wurde; Phasenkontrastobjektiv, 400fache Vergrößerung
- Mitte rechts: Abb. 3.2d: Emulsion in Mikrokosmos 15 nach 28 Tagen Versuchsdauer; Micellen von unterschiedlicher Größe sind zu erkennen. Die größten Micellen haben einen Durchmesser von circa 10 μm , die kleinsten von nur wenigen μm . Die Färbung der Micellen ist proportional zum Durchmesser der Micellen. Lichtfeldmikroskopie, 400fache Vergrößerung
- Unten rechts: Abb. 3.2e: Großes Biofilmaggregat aus Mikrokosmos 15 nach 14 Tagen Versuchszeit. Aggregate dieser Größe waren in allen mit Nährstoffen versorgten Mikrokosmen als „schwarze Flocken“ sichtbar; Dunkelfeldmikroskopie, 100fache Vergrößerung

3.3 Mikrokosmenstudie - Gaschromatographische Analyse von Ölrückständen

Wie bereits oben beschrieben wurden Proben von Ölrückständen in den Mikrokosmen, und zwar entweder von ölkontaminiertem X-Oil oder von dem an der Oberfläche der Mikrokosmenflüssigkeit treibenden Öl genommen, extrahiert und an einem externen Institut analysiert. Bei dieser Analyse wurden einzelne Komponenten des Bunker C – Schweröls zunächst anhand einer Probe des unveränderten Schweröls analysiert. Die Menge der aliphatischen, verzweigten und polyaromatischen Kohlenwasserstoffe und ihr Verhältnis zueinander wurden ermittelt und für die Abbildung 3.3 gleich 100 Prozent gesetzt. Die Mengen derselben Komponenten aus allen entnommenen Proben wurden im Diagramm relativ zu dieser Ausgangsprobe dargestellt. Da bestimmte Bestandteile des Öls im Meerwasser physikalischen und chemischen Prozessen ausgesetzt sind und durch Lösung oder Verdunstung aus dem Öl entfernt werden, wurde zusätzlich eine der Sterilkontrolle in Mikrokosmos 1 entnommen Probe aufgetragen. Wie aus dem Diagramm hervorgeht, machen diese Verluste durch chemische und physikalische Prozesse im Falle der aliphatischen und polyaromatischen Kohlenwasserstoffe innerhalb von 36 Tage je circa 20%, im Falle der verzweigten Kohlenwasserstoffe sogar fast 50% aus.

Vergleicht man jedoch die in den Mikrokosmen nach 36 Tagen ermittelten Werte mit der Sterilkontrolle, so kann man feststellen, dass in diesen Ansätzen weniger Kohlenwasserstoffe vorhanden sind. Die Diskrepanz zwischen chemischen Prozessen und den gemessenen Werten in den Mikrokosmen 7, 19 und 25 sind daher auf biologische Prozesse zurückzuführen.

Zwischen den Versuchstagen sieben und 36 sind quantitative Unterschiede der Ölrückstände aller drei Mikrokosmen zu erkennen: So waren an Tag sieben die gemessenen Konzentrationen der Öl-Komponenten in den Mikrokosmen 19 und 25 annähernd gleich hoch, aber niedriger als im Mikrokosmos 7. Am Versuchstag 36 hingegen war erkennbar, dass im Falle des Mikrokosmos 25 geringe Konzentrationen vorlagen als in Mikrokosmos 19 und darin wiederum geringere als in Mikrokosmos 7. Im erstgenannten Mikrokosmos 25 waren nur noch 2% der aliphatischen, 18% der verzweigten und 5% der polyaromatischen Kohlenwasserstoffe vorhanden. Somit wurden in diesem Mikrokosmos Vergleich zum zu Versuchsbeginn zugegebenen Öl mehr als 93% der gesamten Kohlenwasserstoffe durch sowohl biologische als auch chemische und physikalische Prozesse entfernt. Somit gewährleisteten die in diesem Versuchsansatz gewählten Parameter in dieser Versuchsreihe die besten Bedingungen zur Entfernung von Öl im Meer. Ebenso werden einige Bestandteile schneller abgebaut als andere: so ist nach sieben Tagen zum Beispiel schon ein erheblicher Teil der verzweigten Kohlenwasserstoffe nicht mehr im Öl nachweisbar während die polyaromatischen Kohlenwasserstoffe offensichtlich langsamer abgebaut werden.

Ferner ist zu erkennen, dass am Versuchstag 36 in den Mikrokosmen 19 und 25 nur noch 10 – 15 % der polyaromatischen Kohlenwasserstoffe nachweisbar sind, während im Mikrokosmos 7 noch über 50% dieser Komponenten des Schweröls vorhanden waren. Eine ähnliche Abweichung ist für die Proben an Versuchstag 7 festzustellen; so weisen die Mikrokosmen 19 und 25 ähnliche Konzentrationen aller drei Kohlenwasserstofffraktionen auf, während im Mikrokosmos 7 im Vergleich dazu erheblich mehr aliphatische, erheblich weniger verzweigte, aber vergleichbare Konzentrationen an polyaromatischen Kohlenwasserstoffen vorhanden sind.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist im Substratspektrum von *Alcanivorax borkumensis* zu finden: So kann *A. borkumensis* neben einfachen Zuckern ausschließlich verzweigte und langkettige aliphatische Kohlenwasserstoffe mit sehr hoher Effizienz verwerten^{48, 61}. Aromaten und Polyaromaten werden im Meer meist von anderen Mikroorganismen abgebaut, was meist nach einer Blüte von *Alcanivorax borkumensis* der Fall ist^{27, 51}.

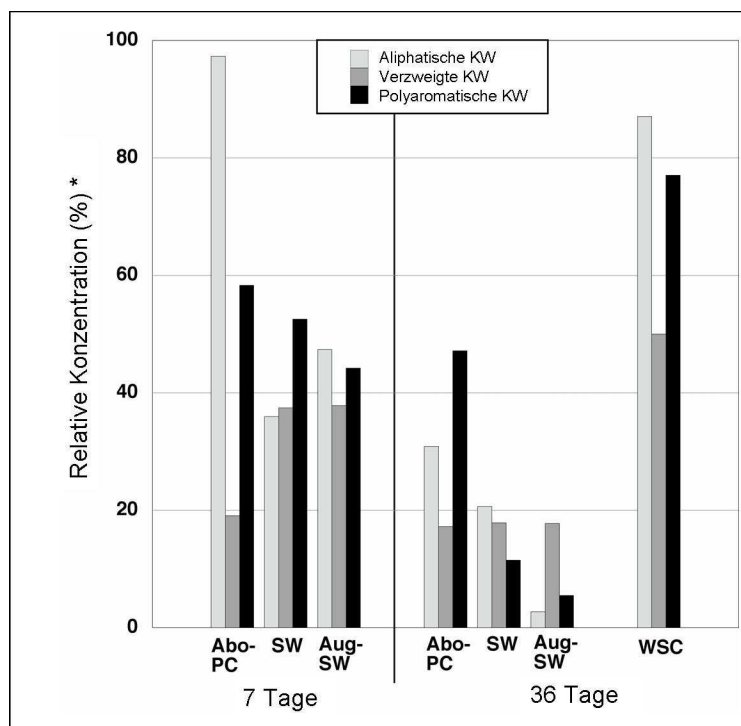


Abb. 3.3: Relative Konzentrationen verschiedener Komponenten des Bunker C – Schweröls in Proben aus den Mikrokosmen 7 (Abo-PC), 19 (SW) und 25 (Aug-SW); die Abkürzungen beziehen sich auf die in den Mikrokosmen vorhandene mikrobielle Gemeinschaft, einer Reinkultur im Falle von Mikrokosmos 7 (*A. borkumensis* Pure Culture), der natürlichen Meerwasser-Mikrobengemeinschaft (seawater) und einer augmentierten Meerwassergemeinschaft (Augmented seawater). WSC bezeichnet die Bestandteile des Bunker C – Öls, welches der Sterilkontrolle in Mikrokosmos 1 nach dem Versuchsende entnommen wurde. Im Diagramm sind Ölrückstände, die sieben bzw. 36 Tagen im Mikrokosmos inkubiert wurden, dargestellt. Die prozentualen Angaben der einzelnen Bestandteile (* relative Konzentration in %) beziehen sich auf die Mengen derselben Komponenten in einer Kontrollmessung mit unverändertem Bunker C – Schweröl, die vor Versuchsbeginn entnommen und gelagert wurde. Hellgraue Balken symbolisieren aliphatische Kohlenwasserstoffe, während mittelgraue verzweigte und schwarze Balken polyaromatische Kohlenwasserstoffe anzeigen.

3.4 Mikrokosmenstudie - Konzentration des gelösten Sauerstoffs und Respiration

Während die Entfernung von Bestandteilen des Öls in einem Biodegradationsexperiment als wichtiger indirekter Nachweis für den Ölabbau gelten, sind parallel dazu immer direkte Nachweise der bakteriellen Aktivität notwendig, beispielsweise die Messung der Respiration. Da die Respiration, die in den Mikrokosmen gemessen wird, die gesamte Aktivität der Mikroorganismen anzeigt und nicht selektiv die der ölabbauenden Bakterien, ist auch dieser Nachweis nur in Kombination mit den anderen hier präsentierten Ergebnissen aussagekräftig. Die Messungen wurden mittels einer Messelektrode für Sauerstoff durchgeführt, die Leitfähigkeitsunterschiede des Wassers durch gelösten Sauerstoff detektiert. Es wurden jeweils beide Parallelansätze der Mikrokosmen untersucht und die Messwerte gemittelt. Ein besonderes Problem stellten dabei Mikrokosmen mit ungebundenem Schweröl dar, welches die Messelektrode stark verschmutzte.

Die Abbildungen 3.4 a - d stellen die Sauerstoffkonzentrationen in allen Mikrokosmen über den gesamten Versuchsablauf dar. Alle Mikrokosmen befanden sich auf demselben Schüttler und hatten denselben Füllstand, so dass in ihnen identische Mengen Sauerstoff in Lösung gehen konnten.

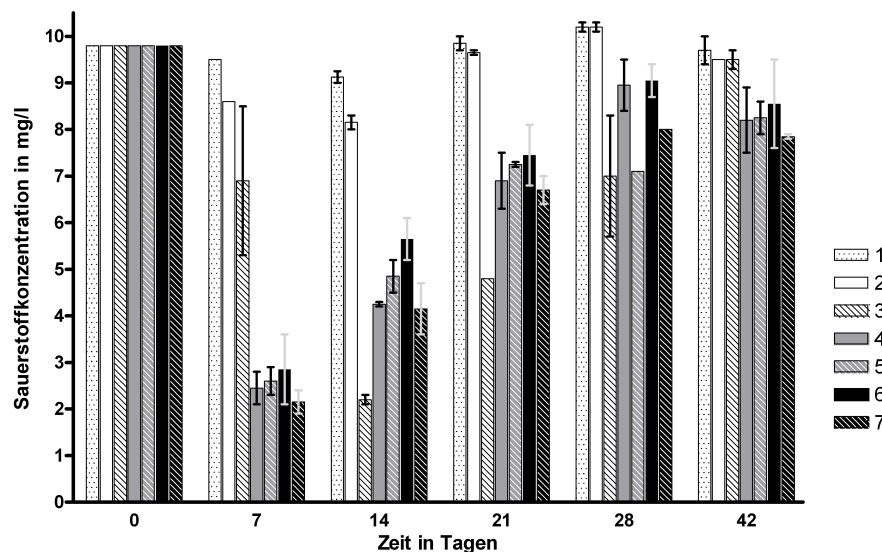


Abb. 3.4a: Sauerstoffkonzentrationen an den Versuchstagen 0, 7, 14, 21, 28 und 42 in den Mikrokosmen 1 – 7. Bei Mikrokosmos 1 handelt es sich um eine Sterilkontrolle. Eine Schraffur der Balken bezeichnet Mikrokosmen mit Nährstoffzugabe nach Gunkel⁷⁰. Eine graue Färbung zeigt die Zugabe von X-Oil aus Leder, eine schwarze Färbung Zugabe von X-Oil aus Altschuh und eine weisse Färbung keine Zugabe des Ölbindemittels an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messungen aus beiden Mikrokosmen an.

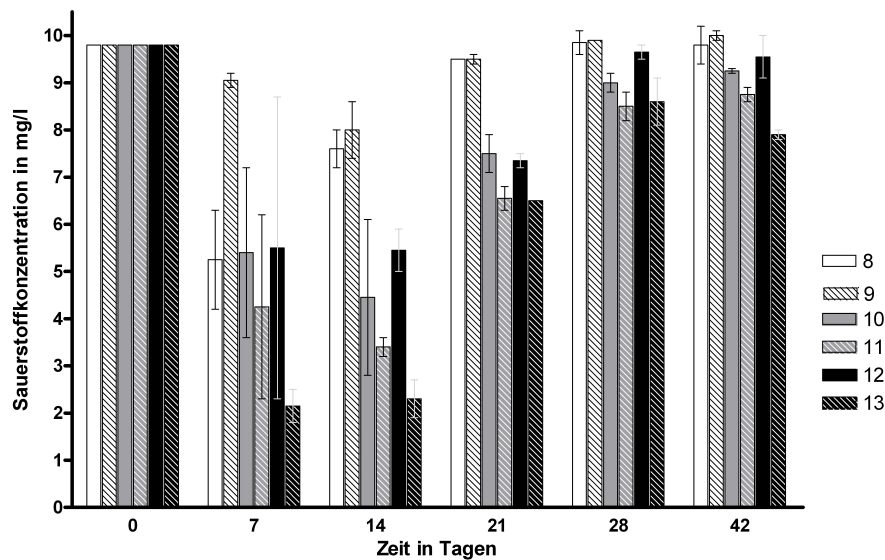


Abb. 3.4b: Sauerstoffkonzentrationen an den Versuchstagen 0, 7, 14, 21, 28 und 42 in den Mikrokosmen 8 – 13. Eine Schraffur der Balken bezeichnet Mikrokosmen mit Nährstoffzugabe nach Gunkel ⁷⁰. Eine graue Färbung zeigt Zugabe von X-Oil aus Leder, eine schwarze Färbung Zugabe von X-Oil aus Altschuh und eine weiße Färbung keine Zugabe des Ölbindemittels an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messungen aus beiden Mikrokosmen an.

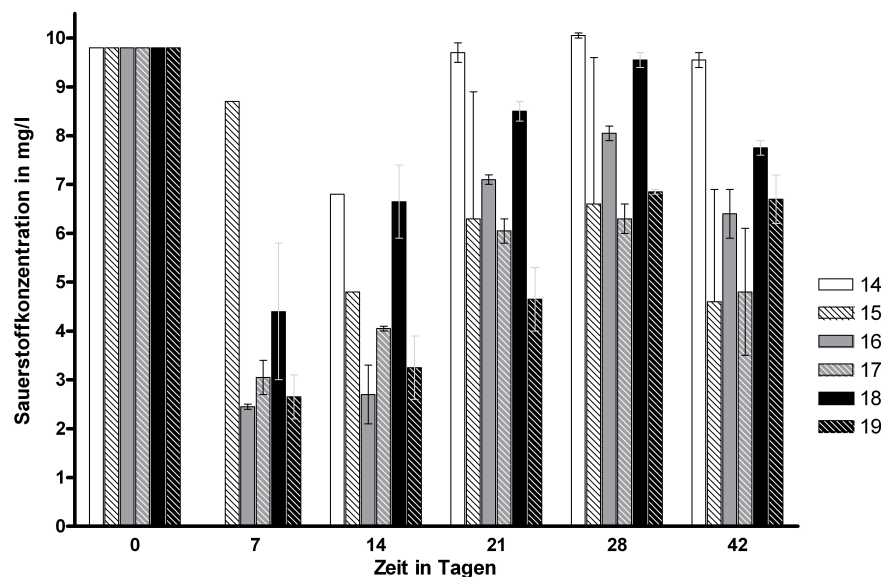


Abb. 3.4c: Sauerstoffkonzentrationen an den Versuchstagen 0, 7, 14, 21, 28 und 42 in den Mikrokosmen 14 – 19. Eine Schraffur der Balken bezeichnet Mikrokosmen mit Nährstoffzugabe nach Gunkel ⁷⁰. Eine graue Färbung zeigt Zugabe von X-Oil aus Leder, eine schwarze Färbung Zugabe von X-Oil aus Altschuh und eine weiße Färbung keine Zugabe des Ölbindemittels an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messungen aus beiden Mikrokosmen an.

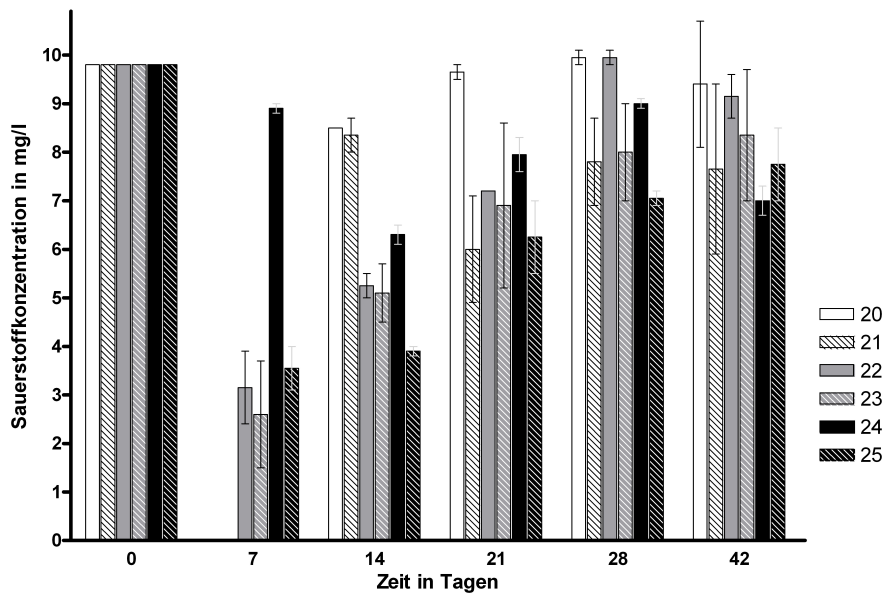


Abb. 3.4d: Sauerstoffkonzentrationen an den Versuchstagen 0, 7, 14, 21, 28 und 42 in den Mikrokosmen 20 – 25. Eine Schraffur der Balken bezeichnet Mikrokosmen mit Nährstoffzugabe nach Gunkel ⁷⁰. Eine graue Färbung zeigt Zugabe von X-Oil aus Leder, eine schwarze Färbung Zugabe von X-Oil aus Altschuh und eine weiße Färbung keine Zugabe des Ölbindemittels an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messungen aus beiden Mikrokosmen an.

Wie in den Abbildungen 3.4a-d erkennbar sind in allen Ansätzen deutliche Unterschiede zu der Sterilkontrolle zu erkennen, in der über den gesamten Versuchsablauf die Konzentration des gelösten Sauerstoffs relativ konstant bei circa 10 mg/l liegt. In den Mikrokosmen 14, 20 und 21 konnten aufgrund der Verschmutzung der Sauerstoffelektrode nur unvollständige Messergebnisse erhalten werden. In allen übrigen Mikrokosmen war ein ähnlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentration zu verzeichnen. Innerhalb der ersten beiden Wochen lagen in allen Mikrokosmen mit Ausnahme der Ansätze 1 und 2 Sauerstoffkonzentrationen um zwei und vier mg/l vor. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchsansätzen, welche mit Nährstoffen versorgt wurden und eine Emulsionsbildung aufwiesen und solchen, die keine solche Aktivität anzeigten. Nach diesem schnellen Absinken der Sauerstoffkonzentrationen pendelten sich diese ebenfalls in allen Versuchsansätzen zwischen sechs und acht mg/l ein. Der Anstieg dieser Konzentration fand dabei in den verschiedenen Mikrokosmen unterschiedlich schnell statt: so wurden in den Mikrokosmen 3 bis sieben bereits in der zweiten Versuchswoche vier bis sechs mg/l gelöster Sauerstoff gemessen. Eine Ausnahme bildet der Ansatz 3, in dem dieser Prozess um ein Woche verschoben stattfindet. In den übrigen Mikrokosmen pendeln sich die Sauerstoffkonzentrationen erst nach drei bis vier Wochen wieder bei sechs bis zehn mg/l ein.

Eine mögliche Erklärung für diesen Prozess ist eine über einen längeren Zeitraum stattfindende Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft und Wachstum von spezialisierten ölabbauenden Bakterien in den Mikrokosmen 15 bis 19, was eine intensivere Respiration erfordert.

Die Methode der direkten Messung mittels einer Sauerstoffelektrode zeigte insbesondere im Vergleich der mit Nährstoffen versorgten und der unbehandelten Mikrokosmen eine nur minimale Diskrepanz, was in Anbetracht der starken Emulsionsbildung in den nach Gunkel versorgten Mikrokosmen Zweifel an der Methode aufwirft. Aufgrund dieser ungeklärten Fragen müssen die oben gezeigten Ergebnisse ebenso wie die Verwendung der Sauerstoffelektrode in Frage gestellt werden.

3.5 Mikrokosmenstudie - Quantitative Bestimmung der Konzentration doppelsträngiger DNA mittels Fluorimetrie

Aufgrund der Unzulänglichkeiten der oben beschriebenen Messung der Sauerstoffkonzentration wurde alternativ eine quantitative Bestimmung der Biomasse, genauer gesagt der Menge an in den Proben vorhandener DNA, durchgeführt. Um möglichst viele Proben unter standardisierten Bedingungen untersuchen zu können wurde ein fluorimetrisches Verfahren mittels des interkalierenden Farbstoffs PicoGreen® durchgeführt. Da sowohl für Anregung als auch Fluoreszenz spezifische Wellenlängen des Lichtes verwendet werden bzw. auftreten, ist das Verfahren sehr zuverlässig.

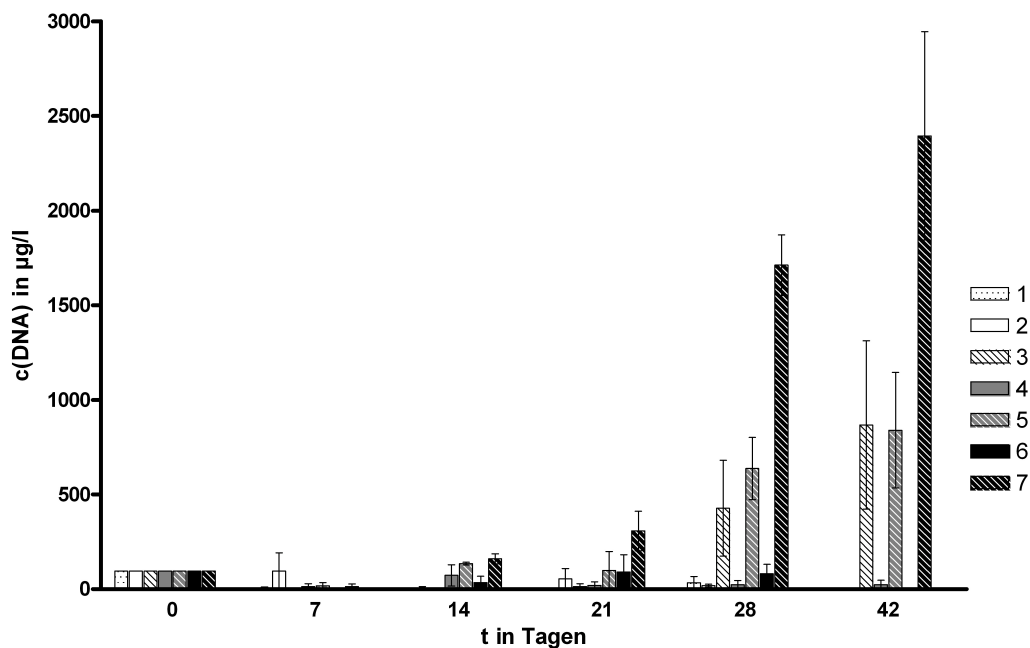


Abb.

3.5a: Konzentrationen doppelsträngiger DNA an den Versuchstagen 0, 7, 14, 21, 28 und 42 in den Mikrokosmen 1 – 7. Eine Schraffur der Balken bezeichnet Mikrokosmen mit Nährstoffzugabe nach Gunkel⁷⁰. Eine graue Färbung zeigt Zugabe von X-Oil aus Leder, eine schwarze Färbung Zugabe von X-Oil aus Altschuh und eine weisse Färbung keine Zugabe des Ölbindemittels an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der je drei Messungen aus beiden Parallelen an.

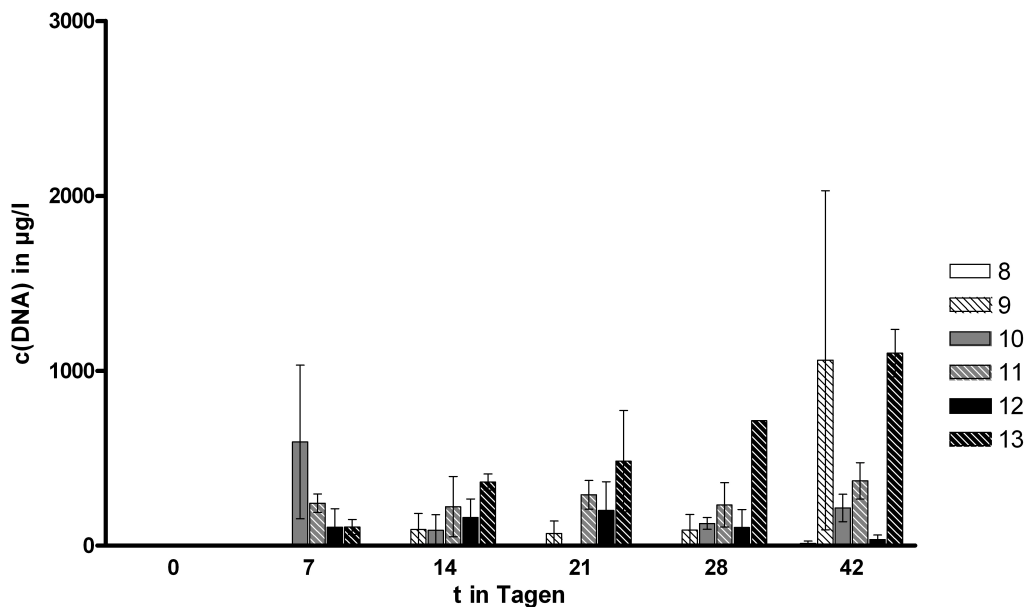


Abb. 3.5b: Konzentrationen doppelsträngiger DNA an den Versuchstagen 0,7 14, 21, 28 und 42 in den Mikrokosmen 8 – 13. Eine Schraffur der Balken bezeichnet Mikrokosmen mit Nährstoffzugabe nach Gunkel⁷⁰. Eine graue Färbung zeigt Zugabe von X-Oil aus Leder, eine schwarze Färbung Zugabe von X-Oil aus Altschuh und eine weisse Färbung keine Zugabe des Ölbindemittels an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der je drei Messungen aus beiden Parallelen an.

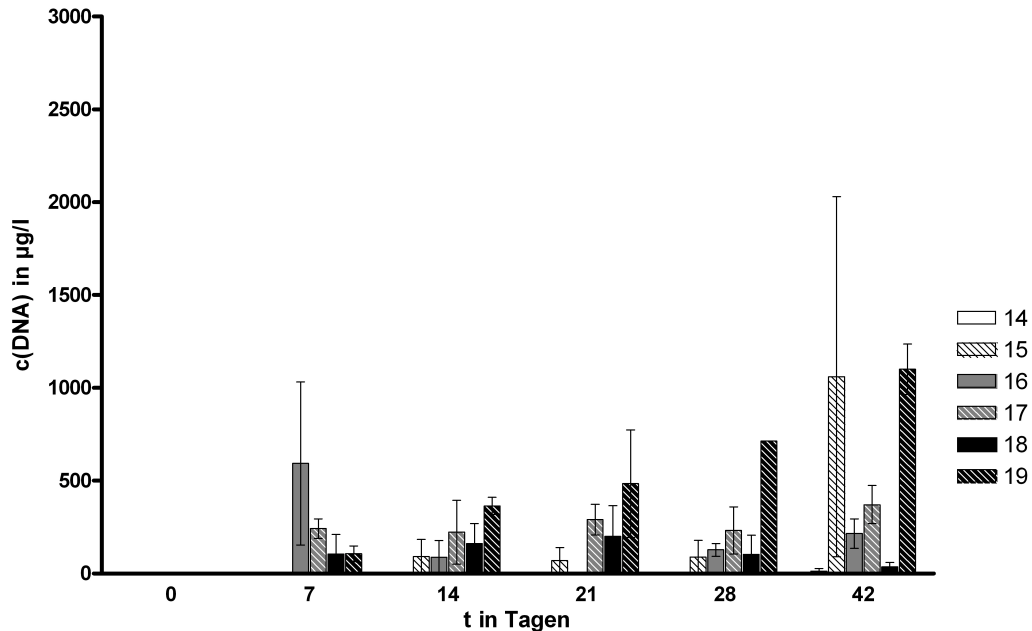


Abb. 3.5c: Konzentrationen doppelsträngiger DNA an den Versuchstagen 0,7 14, 21, 28 und 42 in den Mikrokosmen 14 – 19. Eine Schraffur der Balken bezeichnet Mikrokosmen mit Nährstoffzugabe nach Gunkel⁷⁰. Eine graue Färbung zeigt Zugabe von X-Oil aus Leder, eine schwarze Färbung Zugabe von X-Oil aus Altschuh und eine weisse Färbung keine Zugabe des Ölbindemittels an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der je drei Messungen aus beiden Parallelen an.

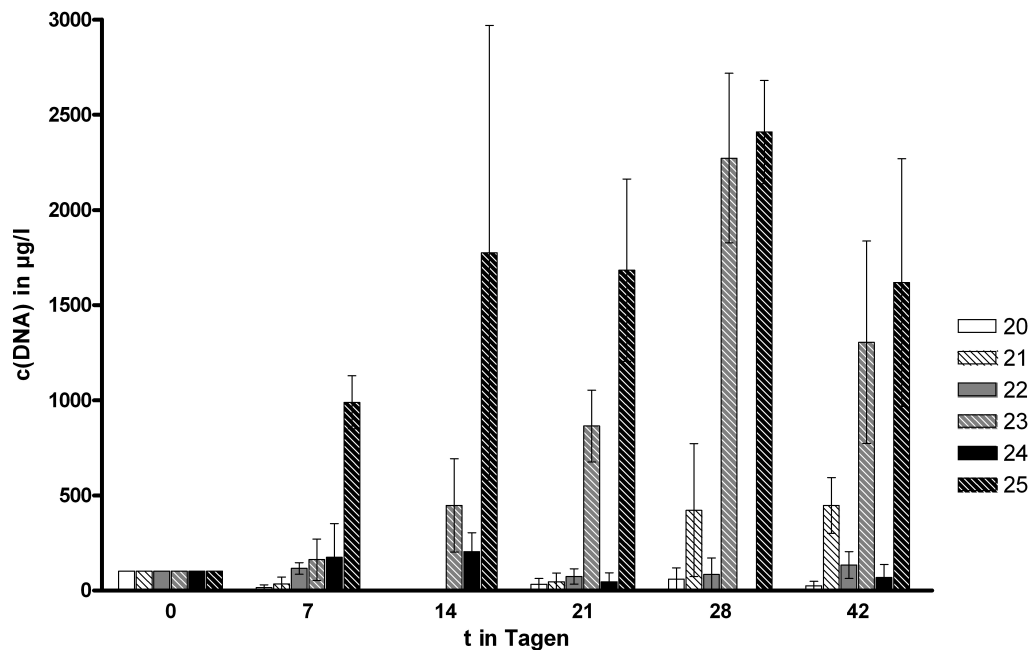


Abb. 3.5d: Konzentrationen doppelsträngiger DNA an den Versuchstagen 0, 7, 14, 21, 28 und 42 in den Mikrokosmen 20 – 25. Eine Schraffur der Balken bezeichnet Mikrokosmen mit Nährstoffzugabe nach Gunkel. Eine graue Färbung zeigt Zugabe von X-Oil aus Leder, eine schwarze Färbung Zugabe von X-Oil aus Altschuh und eine weiße Färbung keine Zugabe des Ölbindemittels an. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der je drei Messungen aus beiden Parallelen an.

Die Abbildungen 3.5a – d zeigen die mittels PicoGreen® ermittelten DNA-Konzentrationen aller Mikrokosmen, wobei jeweils die Dreifachbestimmungen der beiden Mikrokosmenparallelen gemittelt wurden. Die Messwerte zum Versuchsbeginn verdeutlichen die Genauigkeit dieses Verfahrens, da in sämtlichen Mikrokosmen mit Zugabe von *A. borkumensis* bereits zu diesem Zeitpunkt eine geringe Menge DNA nachweisbar ist. In den Ansätzen, welche auf unsterilem Meerwasser basieren hingegen wurde zunächst keine Fluoreszenz durch PicoGreen und somit keine DNA gemessen. Meerwasser enthält im Normalfall ca. 1000 - 10.000 bakterielle Zellen pro ml Wasser, während den augmentierten Mikrokosmen 50.000 Zellen pro ml Mikrokosmenflüssigkeit zugesetzt wurden.

In der Sterilkontrolle (Mikrokosmos 1) wurde über den gesamten Versuchsablauf keine DNA nachgewiesen. Jedoch konnte in den Kontrollen 8 – 13, denen kein Öl zugegeben wurde, zum Teil eine deutliche Fluoreszenz nachgewiesen werden. Berücksichtigt man jedoch die sehr hohen Standardabweichungen dieser Werte, so ist es fraglich, ob diese zuverlässig sind. Das Ölbindemittel X-Oil sondert, wenn dessen Oberfläche nicht von Öl umschlossen ist, Farb- und Gerbstoffe aus. Diese könnten einen störenden Effekt auf die Fluoreszenzmessungen gehabt haben.

Bei genauerer Betrachtung der Abbildungen 3.5a, c und d ist eine auffällig hohe Konzentration doppelsträngiger DNA in allen Mikrokosmen mit Nährstoffzugabe zu erkennen, während in unbehandelten Mikrokosmen kaum DNA nachweisbar ist bzw. die Messwerte im Bereich der Nachweisgrenze liegen.

Ferner sind Unterschiede in den gemessenen DNA-Konzentrationen in Mikrokosmen mit Zugabe von *Alcanivorax borkumensis* und solche ohne diese sichtbar. In Versuchsansätzen mit Bioaugmentation durch *A. borkumensis*, zum Beispiel den Mikrokosmen 7 und 25 werden bis zum Versuchstag 42 Konzentrationen von über 2500 µg/l erreicht, während der analog aufgebaute Mikrokosmos ohne Zugabe von *A. borkumensis*, Mikrokosmos 19 eine DNA-Konzentration von circa 1000 µg/ml aufweist.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Produktion von Biomasse in ölkontaminierten Mikrokosmen in erster Linie von der Zugabe von Nährstoffen abhängt. Dabei gibt es keine Einschränkungen durch die verwendeten Ölbindemittel. Vielmehr sind in mit Ölbindemittel versetzten Mikrokosmen gleich hohe oder höhere Mengen an Biomasse nachweisbar als in solchen ohne eine Zugabe des ölbindenden Materials. Ein verstärkender Effekt bei der Biomasseproduktion scheint im Falle der Bioaugmentation, also der Zugabe von *Alcanivorax borkumensis* aufzutreten, wobei eine geringe Zugabe von Zellmaterial zu einer Verdopplung der Biomasse in den entsprechenden Versuchsansätzen nach vier bis sechs Wochen im Vergleich zu Mikrokosmen ohne Bioaugmentation führte. Jedoch müssen auch hier qualitative Untersuchungen der Bakteriengemeinschaften zeigen, ob die Biomasseproduktion auf ölabbauende Bakterien zurückzuführen ist bzw. diese beinhaltet.

3.6 Mikrokosmenstudie - DNA-Fingerprinting-Methoden: RISA

Wie bereits oben beschrieben wurde für die Mikrokosmenversuche RISA als DNA-Fingerprinting-Methode zur Darstellung der Diversität der Mikroorganismengemeinschaften und deren Dynamik über die Dauer des Experimentes verwendet. Im Folgenden soll ein Überblick über die Veränderungen in den Mikrokosmen 2 bis 7 sowie 14 bis 25 gegeben werden. In der Sterilkontrolle war keine DNA zur Reamplifikation vorhanden. Aus den Ansätzen 8 bis 13 wurde zwar eine geringe Menge DNA isoliert, doch aufgrund einer Kontamination - vermutlich durch Stoffe, die aus dem Ölbindemittel X-Oil in Lösung gingen – konnte keine erfolgreichen PCR-Amplifikation durchgeführt werden.

In den unten gezeigten Abbildungen sind die Fingerprints aller oben genannten Mikrokosmen gezeigt. Es wurden PCR-Produkte von sämtlichen Mikrokosmen-Ansätzen und jeweils von den Versuchstagen 7, 14, 21, 28 und 42 aufgetragen. In den Abbildungen 3.6a bis 3.6i sind jeweils exemplarisch die Proben der Mikrokosmenparallele „A“ aufgetragen. In der Regel waren keine Unterschiede zwischen beiden Parallelansätzen erkennbar. Für die weiter unten aufgeführten statistischen Untersuchungen wurde jedoch der komplette Datensatz aller verfügbaren Proben verwendet.

Auf allen Gelen ist ein 100-Basenpaar-DNA-Marker aufgetragen, der drei intensive Banden enthält. Die untere der intensiven Banden hat eine Länge von 500 Basenpaaren, die mittlere eine Länge von 1500 und die oberste intensive Bande im Gel eine Länge von 5000 Basenpaaren. Die weniger intensiven Banden zwischen diesen drei Banden unterscheiden sich in ihrer Länge um jeweils 100 Basenpaare. Wie aus den Abbildungen 3.6a bis 3.6i hervorgeht, gibt es Unterschiede und Ähnlichkeiten der Fingerprint-Muster, die mit den Versuchsparametern korrelieren:

Einer der offensichtlichsten und schon einleitend aufgeführten Unterschiede ist die Zufuhr von Nährstoffen in den Mikrokosmen. In allen Mustern von Mikrokosmen mit geraden Zahlen, denen keine Nährstoffe zugegeben wurden sind mehr Banden in den einzelnen Spuren zu erkennen, als in den entsprechenden Mikrokosmen mit einer solchen Nährstoffzufuhr.

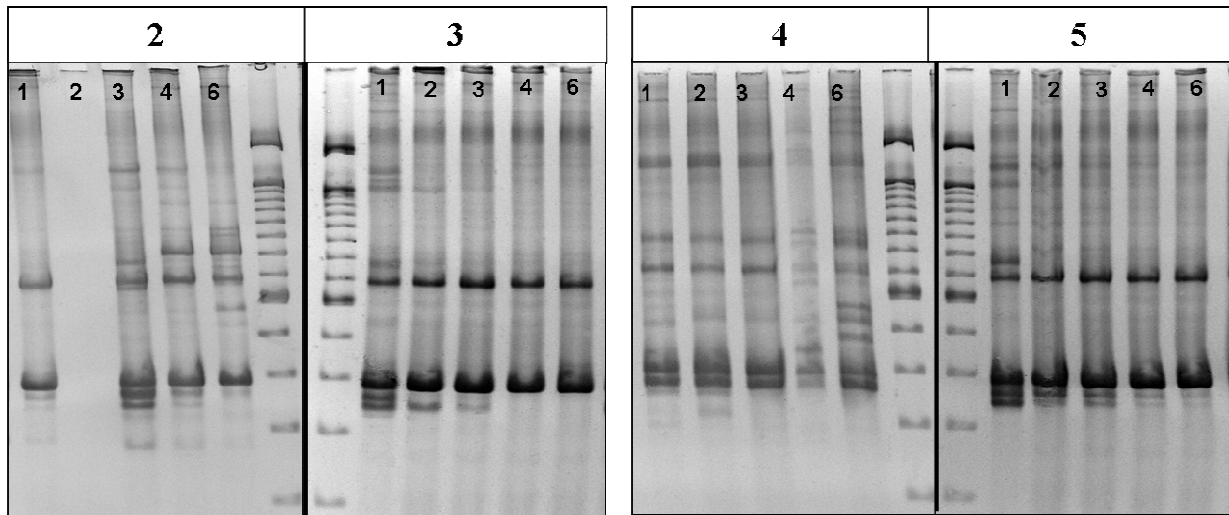


Abb. 3.6a (l.) und 3.6b (r.): DNA-Fingerprinting-Muster aus den Mikrokosmen 2 und 3, bzw. 4 und 5. Jeweils aufgetragen sind Proben aus der ersten bis vierten sowie der sechsten Versuchswoche (Beschriftung am oberen Rand). Die unbeschrifteten Spuren enthalten einen 100bp-DNA ladder Marker (Invitrogen), dessen Banden sich wie oben beschrieben zusammensetzen.

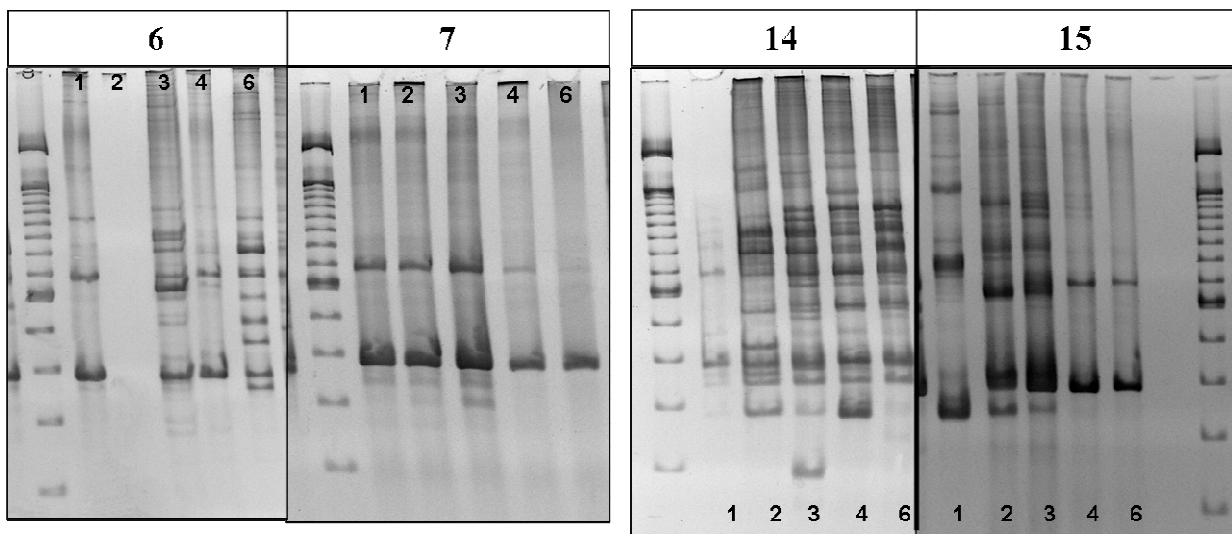


Abb. 3.6c (l.) und 3.6d (r.): DNA-Fingerprinting-Muster aus den Mikrokosmen 6 und 7, bzw. 14 und 15. Jeweils aufgetragen sind Proben aus der ersten bis vierten sowie der sechsten Versuchswoche (Beschriftung am oberen bzw. unteren Rand). Die unbeschrifteten Spuren enthalten einen 100bp-DNA ladder Marker (Invitrogen), dessen Banden sich wie oben beschrieben zusammensetzen.

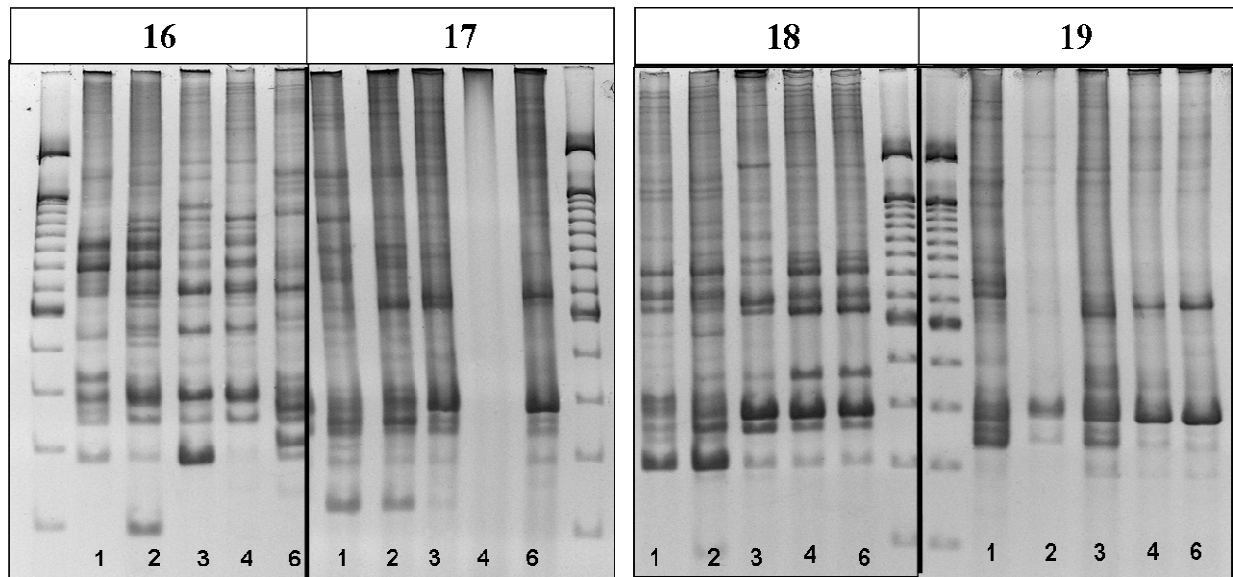


Abb. 3.6e (l.) und 3.6f (r.): DNA-Fingerprinting-Muster aus den Mikrokosmen 2 und 3, bzw. 4 und 5. Jeweils aufgetragen sind Proben aus der ersten bis vierten sowie der sechsten Versuchswoche (Beschriftung am unteren Rand). Die unbeschrifteten Spuren enthalten einen 100bp-DNA ladder Marker (Invitrogen), dessen Banden sich wie oben beschrieben zusammensetzen.

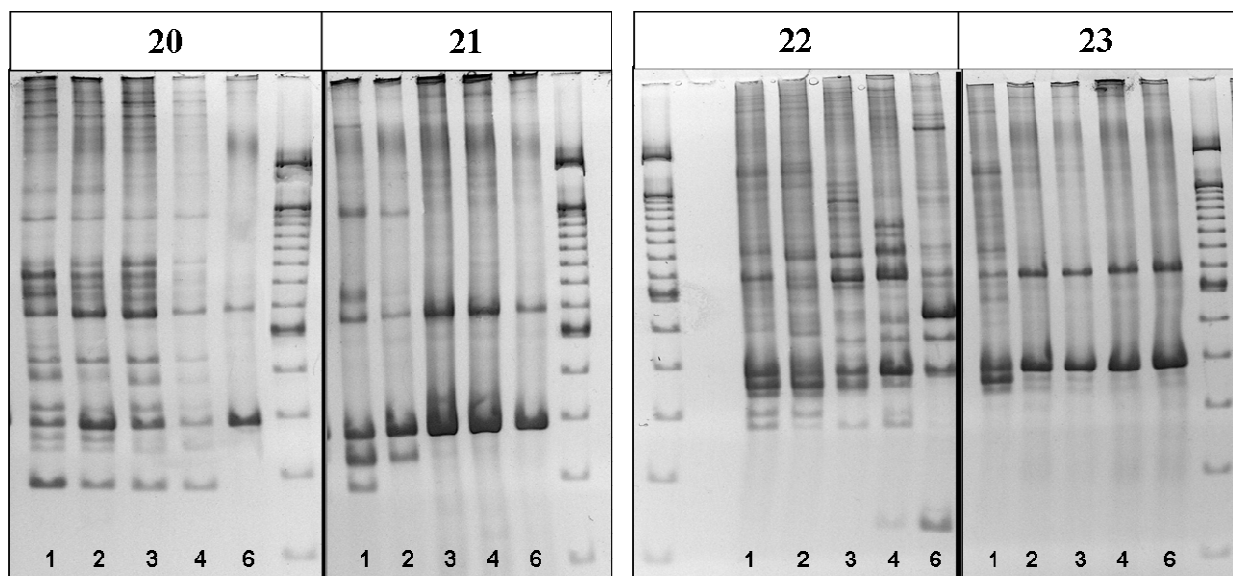


Abb. 3.6g (l.) und 3.6h (r.): DNA-Fingerprinting-Muster aus den Mikrokosmen 20 und 21, bzw. 22 und 23. Jeweils aufgetragen sind Proben aus der ersten bis vierten sowie der sechsten Versuchswoche (Beschriftung am unteren Rand). Die unbeschrifteten Spuren enthalten einen 100bp-DNA ladder Marker (Invitrogen), dessen Banden sich wie oben beschrieben zusammensetzen.

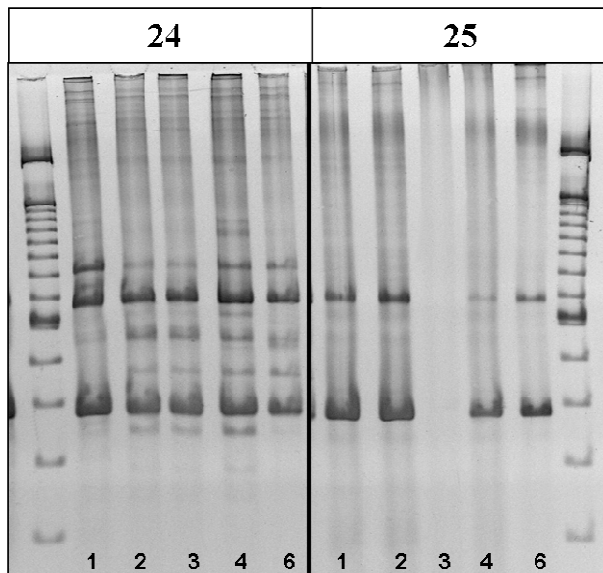


Abb. 3.6i: DNA-Fingerprinting-Muster aus den Mikrokosmen 24 und 25. Jeweils aufgetragen sind Proben aus der ersten bis vierten sowie der sechsten Versuchswoche (Beschriftung am unteren Rand). Die unbeschrifteten Spuren enthalten einen 100bp-DNA ladder Marker (Invitrogen), dessen Banden sich wie oben beschrieben zusammensetzen.

Besonders deutlich ist dieser Effekt in den Ansätzen 20, 22 und 24 und den dazugehörigen Ansätzen 21, 23 und 24 zu sehen. Es sind in den Spuren der 1, 2 und 3 der Ansätze 20, 22 und 24 zwischen zehn und 30 Banden von unterschiedlicher Intensität, in dem Ansatz 23 und insbesondere im 25 sind hingegen ab der Spur 2 nur noch zwei sehr intensive Banden zu erkennen.

Diese Banden, die bei 300 bzw. circa 600 Basenpaaren im Gel auftreten, sind in ebenso in den Mikrokosmen 3, 5 und sieben sowie in der Spur 1 der Ansätze 2, 4 und 6 vorhanden. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Banden durch *Alcanivorax borkumensis* verursacht werden.

Ein weiterer Faktor der Versuchsaufbauten, der sich in den Fingerprinting-Mustern niederschlägt, ist die Zugabe von *A. borkumensis* zu den einzelnen Mikrokosmen. In den Ansätzen 2 bis 7 sollten Reinkulturen von *A. borkumensis* gezüchtet werden. In der Tat sind wie oben erwähnt in den Mikrokosmen 3, 5 und 7 zwei sehr intensive Banden, die auf diesen Organismus zurückzuführen sind, vorhanden. Die Mikrokosmen 2, 4 und 6 weisen in der ersten Woche ebenfalls diese Banden auf. Jedoch sind ab der Spur 2 auch andere Banden in den letztgenannten Mikrokosmen zu erkennen, welche auf Kontaminationen durch das Ölbindemittel, welches nicht sterilisiert werden konnte, zurückzuführen sein könnten.

Die Mikrokosmen 14 bis 19 weisen vollständig andere Muster auf: Hier treten in den Mikrokosmen 14 bis 19 innerhalb der ersten Woche unterschiedliche Profile mit zum Teil mehr als 20 Banden unterschiedlichster Intensität auf. Im Falle der nicht mit Nährstoffen behandelten Mikrokosmen 14, 16 und 18 bleibt die Anzahl der Banden über die gesamten sechs Wochen des Versuches relativ hoch. Die mit Nährstoffen behandelten Mikrokosmen 15, 17 und 19 hingegen zeigen eindeutige Tendenzen in Bezug auf die mikrobiellen Gemeinschaften: So wiesen die Mikrokosmen 15 und 19 ab der dritten Versuchswoche die beschriebenen charakteristischen Banden für *A. borkumensis* auf. Die Analyse der Mikrobengemeinschaften in auf Meerwasser basierenden Mikrokosmen deuten also auf eine

Verschiebung der zunächst sehr diversen Gemeinschaften zugunsten von *A. borkumensis* hin, wobei die Zugabe von Nährstoffen einen starken Selektionsdruck ausübt.

Die durch Zugabe von *Alcanivorax borkumensis* zu Meerwasser hergestellten Mikrokosmen weisen Bandenprofile auf, die zunächst den auf Meerwasser basierenden Mikrokosmen ähneln: Auch bei diesen ist in der ersten Versuchswoche eine hohe Zahl von Banden zu erkennen. Jedoch sind die beiden Banden, die auf *A. borkumensis* hindeuten, in den Mikrokosmen 20 – 25 über den gesamten Versuchsablauf deutlich sichtbar.

Wie im Falle der Meerwasser-Mikrokosmen bleibt auch bei den nicht mit Nährstoffen versorgten die Anzahl der Banden relativ hoch, während die mit Nährstoffen versorgten Mikrokosmen nach einer bis drei Wochen nur noch die beiden besagten Banden zeigten. Im Falle des Mikrokosmos 25 ist sogar eine sehr schnelle Einstellung dieses Trends innerhalb der ersten 7 Tage zu erkennen.

Ein dritter Faktor, der die Mikrokosmen unterscheidet, ist die Zugabe von Ölbindemitteln. Da eine Emulsionsbildung auch in Mikrokosmen ohne X-Oil stattfand, scheint diese Bindemittel zunächst keine negativen Einflüsse auf den Prozess des mikrobiellen Ölabbau zu haben. In der Tat sind in allen mit Nährstoffen versorgten Mikrokosmen auch nach kurzer Zeit die beiden für *Alcanivorax borkumensis* charakteristischen Banden in den RISA-Profilen zu erkennen. Dieser Prozess tritt jedoch unterschiedlich schnell auf: In Mikrokosmos 21, der kein Ölbindemittel enthält, sind die beiden Banden nach drei Wochen deutlich erkennbar, während sie in Mikrokosmos 23 nach zwei und in Mikrokosmos 25 schon nach einer Woche auftreten. Ein ähnlicher Prozess ist für die Mikrokosmen 17 und 19 festzustellen.

Es deutet sich somit die Tendenz an, dass X-Oil aus Altschuh (Mikrokosmen 19 und 25) im Versuch positivere oder weniger negativere Auswirkungen auf den Prozess des biologischen Ölabbau hat, als das aus Leder und Textilien hergestellte X-Oil. Wie bereits erwähnt, werden im Verlauf des Versuches nach und nach Farbstoffe, Gerbstoffe und ähnliche Chemikalien aus dem Ölbindemittel gelöst, die den pH-Wert des umgebenden Wassers senken.

Für die Gesamtheit der oben aufgeführten RISA-Profile der untersuchten Mikrokosmen ist festzuhalten, dass eine Nährstoffzugabe offensichtlich einen Selektionsdruck auf die mikrobiellen Gemeinschaften des Meeres ausübt, der sich zu Gunsten von *Alcanivorax borkumensis* ausübt.

3.7 Mikrokosmenstudie - Statistische Analyse der Fingerprintmuster und Multidimensional Scaling Analysis (MDS)

Wie bereits zuvor beschrieben lagen durch die Vielzahl an Mikrokosmen und Messzeitpunkten mehr als 200 verschiedene durch RISA erhaltene Bandenmuster der einzelnen mikrobiellen Gemeinschaften vor. Ein Vergleich jedes dieser Muster mit dem Rest der Bandenprofile ist daher nicht möglich. Andererseits bietet diese Vielzahl die Möglichkeit einer statistischen Analyse, durch die die Auswirkungen einzelner Versuchsparameter auf die mikrobiellen Gemeinschaften untersucht werden können. Hierzu wurden die Bandenmuster digitalisiert, die Länge der einzelnen Banden bestimmt und somit Bandenklassen erstellt. Parallel hierzu wurden Versuchsparameter wie zum Beispiel Nährstoffzugabe mit den einzelnen Bandenmustern verknüpft. Die Gesamtheit der Bandenmuster wurde im Rahmen eines Band-Matchings nach den Bandenklassen durchsucht. Die einzelnen Muster wurden durch eine Matrix- sowie eine weiterführende Multi-Dimensional-Scaling-Analyse als Punkte auf einer zweidimensionalen Fläche dargestellt.

Nat. Gemeinschaft

Nat. Gemeinschaft, Bioaugmentation

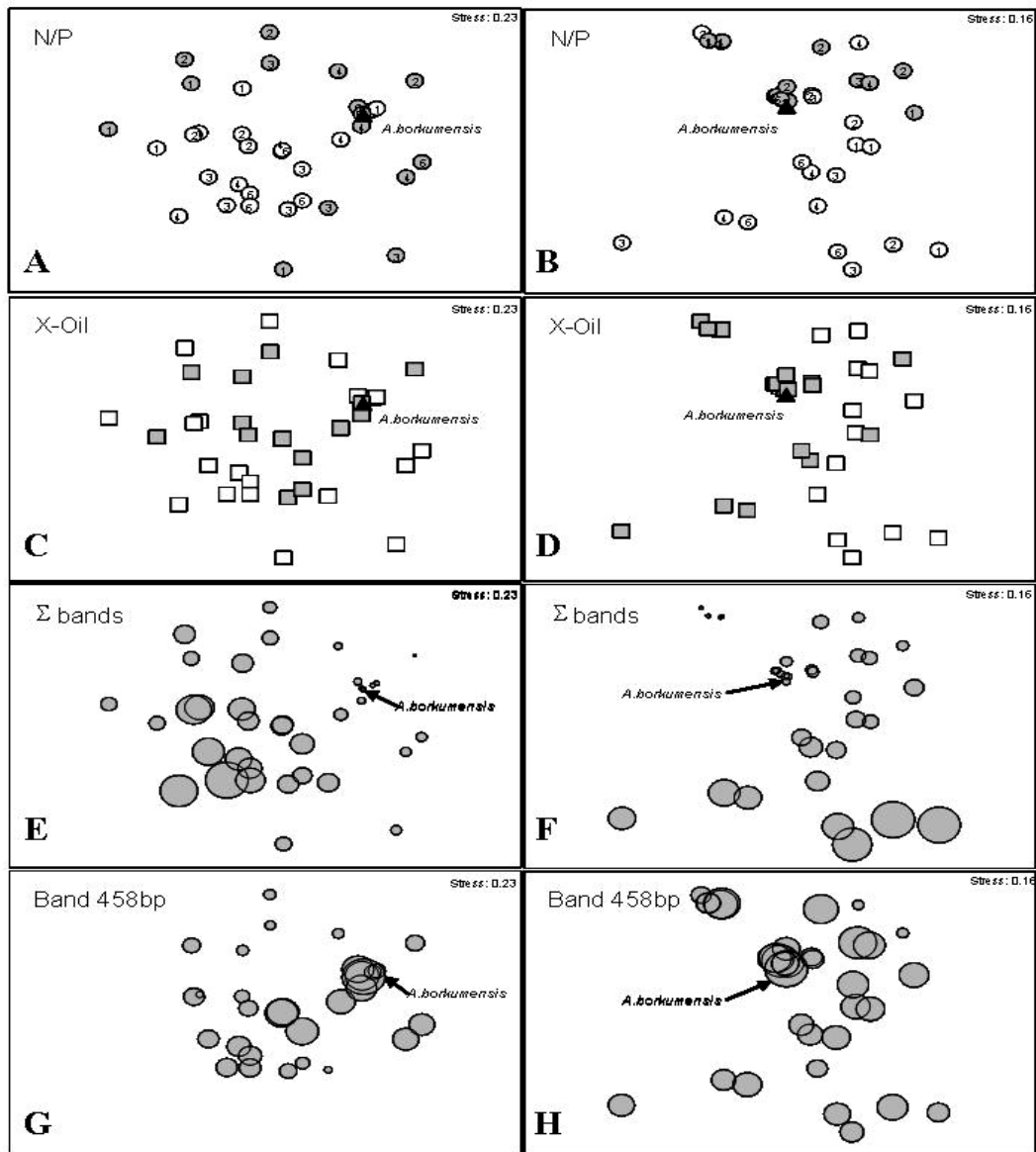


Abb. 3.7 A-H: Multivariate Statistik der RISA DNA-Fingerprintmuster unter Verwendung einer Multidimensional Scaling – Analyse; Abb. 3.7 A, C, E und G zeigen die Bandenmuster aus den Mikrokosmen 14 – 19, Abb. 3.7 B, D, F, H Bandenmuster aus den Ansätzen 20 - 25. 3.7 A und B zeigen den Einfluss von Nährstoffzugabe, wobei graue Kreise Ansätze mit, weisse Kreise Ansätze ohne Nährstoffzugabe darstellen. 3.7 C und D zeigen den Einfluss verschiedener Arten von Ölbindemittel; graue Quadrate stehen für Ansätze mit X-Oil aus Altschuh, weisse Quadrate für X-Oil aus Leder. Abb. 3.7 E und F zeigen Unterschiede in der Anzahl der Banden in den verschiedenen Ansätzen, wobei der Durchmesser der Kreise proportional ist zur Anzahl der Banden in den einzelnen Bandenmustern. In den Abb. 3.7 G und H ist hingegen die Intensität einer Bande, die charakteristisch ist für *A. borkumensis* und eine Länge von 458 Basenpaaren aufweist, aufgetragen. In diesen Diagrammen ist die Intensität der besagten Banden proportional zum Durchmesser des Kreises. In sämtlichen Diagrammen ist als Referenzpunkt das durch eine Reinkultur von *A. borkumensis* verursachte Bandenmuster beigelegt und markiert.

Für die MDS-Diagramme wurden zwei verschiedene Datensätze analysiert: Zum einen wurden sämtliche Bandenmuster der auf Meerwasser basierenden Ansätze 14 bis 19 untersucht, zum anderen alle Bandenprofile der augmentierten Mikrokosmen 20 bis 25. Anhand der vorliegenden Datensätze können die Einflüsse verschiedener Faktoren auf die natürliche sowie auf eine mit *A. borkumensis* angereicherte Kultur untersucht werden. Alle acht Diagramme zeigen deckungsgleiche Grafiken, bei der dieselben Datenpunkte an den immer gleichen Punkten aufgetragen wurden. Jedoch wechselt die Darstellung der Versuchsparameter, die zu den entsprechenden Bandenmustern geführt haben.

Die Abb. 3.7 A und B zeigen die Auswirkungen der Nährstoffzufuhr auf beide Datensätze; in beiden Fällen ist eine deutliche Ballung der grau gefärbten Datenpunkte um den Referenzpunkt von *A. borkumensis* zu erkennen, während weiss gefärbte Datenpunkte auf der Diagrammfläche unregelmässig verteilt sind. Im Falle von 3.7 A liegen auch einige graue Datenpunkte verstreut auf der Diagrammfläche, während in 3.7 B alle diese Punkte dicht am Referenzpunkt liegen.

Die Einflüsse der verschiedenen Sorten von X-Oil werden in den Diagrammen 3.7 C und D dargestellt. Dabei ist in beiden Diagrammen wiederum die Ballung von Bandenmustern um den Referenzpunkt von *A. borkumensis* zu erkennen. Im Gegensatz zur Nährstoffzugabe besteht jedoch keine offensichtliche Verbindung mit einer Sorte von Datenpunkten: Sowohl graue als auch weisse Quadrate sind ohne erkennbares Muster über die Diagrammfläche verstreut. Beide Sorten des X-Oils verhalten sich trotz der unterschiedlichen Zusammensetzung also neutral in Bezug auf die mikrobiellen Gemeinschaften.

Die weiteren Diagramme müssen in Kombination betrachtet werden, da miteinander verbundene Parameter aufgetragen wurden: Die Abb. 3.7 E und F zeigen die Anzahl der Banden anhand verschieden großer Kreise an. Dieser Wert gibt einen Hinweis auf die Diversität der einzelnen mikrobiellen Gemeinschaften jedes Datenpunktes. In den Diagrammen 3.7 G und H werden die Intensitäten einer einzelnen für *A. borkumensis* charakteristischen Referenzbande an. Der Durchmesser der Kreise ist proportional zur Anzahl der Banden bzw. der Intensität der Referenzbande. Im Falle der Mikrokosmen 14 bis 19 treten somit in Abb. 3.7 E hauptsächlich Bandenmuster, die aus vielen Banden bestehen, auf. Auf der rechten Seite der Abbildung tritt eine Häufung von Kreisen mit geringem Durchmesser auf, deren Bandenmuster nur wenige Banden aufweisen. Ein Vergleich mit Abb. 3.6 G zeigt ein genau gegenläufiges Bild: Die Mehrzahl der Datenpunkte zeigt Kreise mit einem relativ großen Durchmesser. Im Bereich der Ballung von Datenpunkten, die bereits beschrieben wurden, weisen die Kreise einen besonders großen Durchmesser auf.

Eine ähnliche Aufteilung der Datenpunkte ist für die Abb. 3.7 F und H zu verzeichnen, bei denen die Bandenmuster der mit *A. borkumensis* angereicherten Meerwasser-Mikrokosmen 20 bis 25 aufgetragen wurden. Es ist ebenfalls in beiden Diagrammen eine deutliche Ballung von Datenpunkten erkennbar. In Abb. 3.7 F zeigt sich eine deutliche Konzentration von Datenpunkten mit hoher Diversität am unteren Rand des Diagramms. Analog zur Abb. 3.7 G ist auch bei diesen Datenpunkten eine hohe Intensität der Referenzbande von *A. borkumensis* festzustellen.

Ein Vergleich aller Diagramme lässt den Rückschluss zu, dass *A. borkumensis* in allen Mikrokosmen eine zentrale Rolle spielt. Wie bereits die in den Abb. 3.6 a – i präsentierten einzelnen Bandenprofile zeigt die MDS-Analyse, dass sowohl in den auf Meerwasser basierenden als auch in den mit *A. borkumensis* angereicherten Ansätzen eine Verschiebung der mikrobiellen Gemeinschaften zugunsten von *A. borkumensis* in Folge der Nährstoffzugabe stattfindet. Dabei ist es in einigen Ansätzen zu einer extremen Verschiebung und Reduktion der Diversität gekommen, in deren Folge in den Mikrokosmen offensichtlich eine von *A. borkumensis* dominierte Gemeinschaft vorhanden war. Hierbei ist besonders bemerkenswert, dass auch die auf Meerwasser basierenden Mikrokosmen diesen Prozess durchmachten. Dies zeigt das Potenzial dieses ölabbauenden Mikroorganismus sowie seine einzigartige Anpassung an Ölverschmutzungen im Meerwasser.

3.8 Mikrokosmenstudie - DGGE (Denaturierende Gradientengelelektrophorese)

Die Abbildungen 3.8 a und b zeigen exemplarische DGGE-Fingerprinting-Analysen bzw. Bandenmuster. Aufgetragen wurden die Proben aus den Mikrokosmen 14, 15, 18, 19, 20, 21, 24 und 25. Diese Mikrokosmen ermöglichen eine Unterscheidung zwischen mit Nährstoffen versorgten und nicht versorgten, zwischen auf Meerwasser basierenden und mit *A. borkumensis* angereicherten Meerwasser-Mikrokosmen sowie solchen, mit und ohne Zugabe von X-Oil aus Altschuh. Um Veränderungen über die Zeit sichtbar zu machen, wurden Proben aus der ersten, dritten und sechsten Woche aufgetragen. Durch Extraktion, Reamplifikation der DNA und Sequenzierung wurden die in den Abbildungen 3.8a und b markierten Banden identifiziert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 3.I aufgeführt.

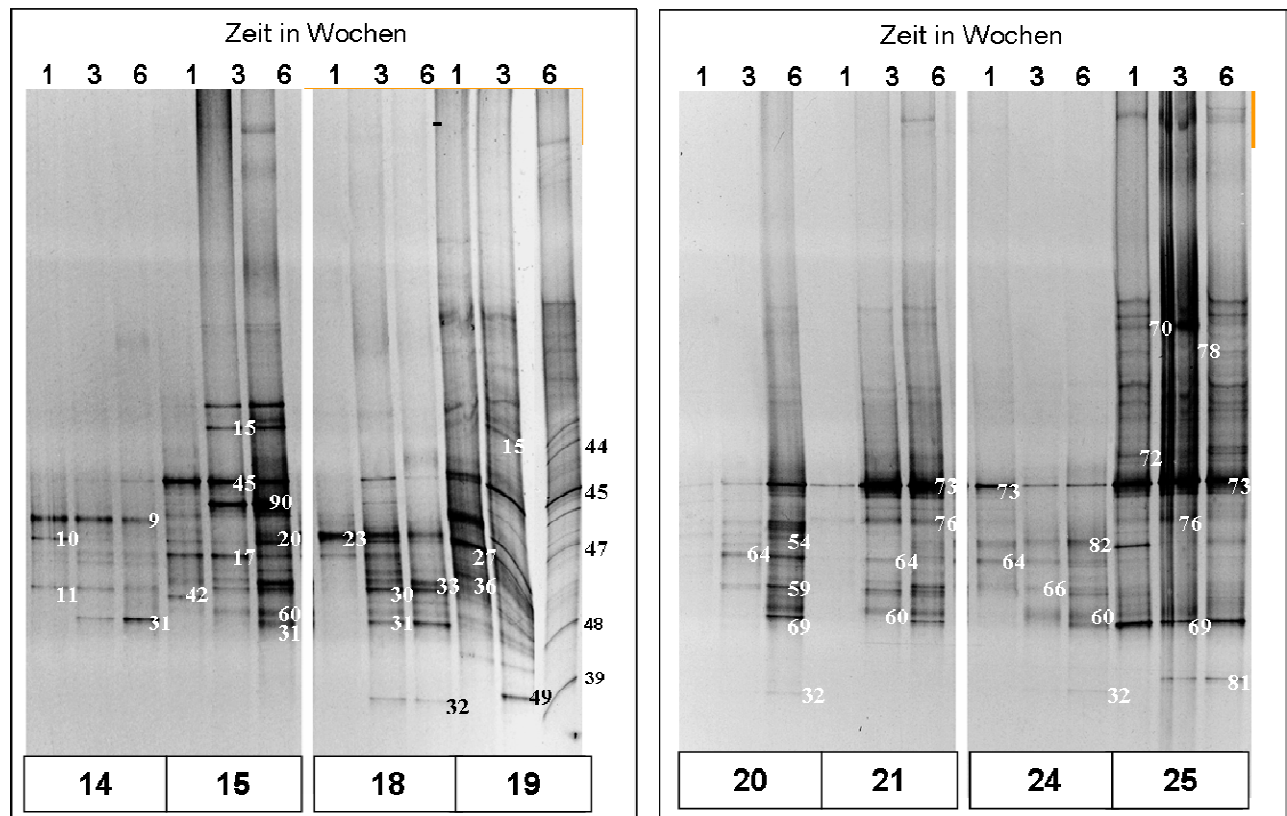


Abb. 3.8a (l.) und 3.8b (r.):

Mittels DGGE erstellte DNA-Fingerprints der Mikrokosmenansätze 14, 15, 18, 19, 20, 21, 24 und 25. Die Nummer der Mikrokosmen ist am unteren Ende der Gele angegeben. Aufgetragen sind jeweils die Proben aus der Parallele „A“ aus den Versuchswochen 1, 3 und 6 (Beschriftung am oberen Ende der Gele). Alle Fingerprint-Muster wurden anhand eines Markers aneinander angeglichen. Die extrahierten und in Tab. 3.I sowie Abb. 3.9a und b erwähnten Banden sind in den Gelen mit den Nummern 7 bis 82 markiert. Fehlende Nummern sind zurückzuführen auf fehlgeschlagene Extraktion oder Reamplifikation. Die beiden verzerrten Profile des Mikrokosmos 19 befanden sich ursprünglich an den Rändern der DGGE-Gele und sind aufgrund eines „smiling effects“, der vermutlich durch Adhäsion der Acrylamidlösung an die Spacer zustande kommt, verschoben.

Die Abbildungen 3.9a und b zeigen im Vergleich zu den Ergebnissen der RISA-Fingerprints ein genau gegenteiliges Ergebnis: während die mit Nährstoffen versorgten Mikrokosmen 15, 17, 21 und 25 in den RISA-Gelen nur wenige Banden im Vergleich zu den korrespondierenden Mikrokosmen ohne Nährstoffzugabe aufwiesen, ist die Zahl der durch DGGE nachgewiesenen Banden im Falle der Zugabe von Nährstoffen höher. Eine mögliche Erklärung für die geringe Zahl von Banden in den mit Nährstoff versorgten Mikrokosmen liegt in der geringeren Sensitivität der Primer und der Methodik der RISA. So werden durch die spezifischen Primer der DGGE nach Muyzer auch Bakterien erfasst, die in vergleichbar niedrigen Konzentrationen vorliegen.

Wie in den Abb. 3.9a und b erkennbar, sind die Bandenprofile der einzelnen Mikrokosmen relativ verschieden voneinander, obwohl gewisse Ähnlichkeiten der Bandenmuster der Mikrokosmen 20 und 21 sowie der Mikrokosmen 15 und 21 bestehen. Betrachtet man jedoch die Profile innerhalb jedes Mikrokosmos über die Zeit, so stellt man fest, dass sich die Muster zwischen der dritten und sechsten

Woche aller Mikrokosmen kaum oder gar nicht ändern. Besonders auffällig sind die Ähnlichkeiten der Fingerprints der Mikrokosmen 19, 21 und 25, bei denen sich eine mikrobielle Gemeinschaft innerhalb der ersten Woche einstellt und innerhalb der nächsten fünf Wochen nur geringfügig ändert. Ein Gegenbeispiel sind die Mikrokosmen 18 und 20, bei denen ein steter Wandel der Gemeinschaften zu verzeichnen ist. Die könnte jedoch auch bedingt sein durch langsames Wachstum und langsame Veränderung bedingt durch einen Mangel an Nährstoffen. Offensichtlich bieten die Nährstoffzugabe in Verbindung mit der Versuchstemperatur von 18°C so gute Bedingungen, dass sich innerhalb der Mikrokosmen bereits in sieben oder weniger Tagen Klimaxgesellschaften um ölabbauende Mikroorganismen bilden und über den Versuch hinweg relativ stabil bleiben.

Deutliche Unterschiede bestehen zwischen den Bandenmustern von Mikrokosmen mit oder ohne Ölbindemittelzugabe, zum Beispiel im oberen Teil der Profile der Ansätze 19 und 25. Besonders klar werden diese Unterschiede beim Vergleich der Ansätze 15 und 21 mit den korrespondierenden mit X-Oil behandelten Mikrokosmosmen 19 und 25. Wie bereits oben erwähnt wirkt sich das Ölbindemittel X-Oil durch die Ausschwemmung von Chemikalien, die den pH-Wert beeinflussen, auf die mikrobiellen Gemeinschaften aus.

Bei genauerer Betrachtung einzelner Banden fallen insbesondere die Banden 45 und 73 auf, die in allen Mikrokosmen, jedoch besonders intensiv in den Mikrokosmen 15, 19, 20, 21 und 25 erkennbar sind. Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten, dass diese Bande durch *Alcanivorax borkumensis* verursacht wird. Dies unterstützt die Ergebnisse der RISA-Fingerprints und betont noch einmal die Wichtigkeit dieses Bakteriums für den Ölabbau. Darüber hinaus ist anhand der Bandenmuster der Mikrokosmen 14 bis 19 deutlich erkennbar, dass selbst in Meerwasser ohne Zugabe von *A. borkumensis* und ohne Nährstoffzugabe dieser Organismus in den Mikrokosmen angereichert wird. Eine besonders wichtige Erkenntnis ist jedoch, dass es offensichtlich keine störenden Einflüsse des X-Oils auf die Abundanz von *A. borkumensis* gibt. So ist die intensive Bande von *A. borkumensis* in den Mikrokosmen 19 und 25 ebenso wie im Mikrokosmos 15 bereits nach einer Woche vorhanden. Im Falle von Mikrokosmos 25 tritt die Bande somit sogar früher auf als im Mikrokosmos 21, der kein X-Oil enthält.

Tab. 3.I: Vergleich der DNA-Sequenzen der extrahierten Banden mit DNA-Sequenzen aus der Datenbank GenBank mittels BlastN. Angegeben sind die Nummer der in Abb. 3.9a und b aufgeführten Sequenzen der DNA aus den Banden sowie die ermittelte DNA-Sequenz (GenBank Accession Nr.) mit der höchsten prozentualen Ähnlichkeit. Zusätzlich angegeben ist die zu jeder Sequenz ermittelte Art sowie deren phylogenetische Zuordnung. Alle ausgeschnittenen Banden wurden mit dem forward- und dem reverse primer sequenziert und ein sequence assembly (Überlagerung und Korrektur der beiden Sequenzen) mittels der CAP-Subroutine des Programms Bioedit durchgeführt.

Bande Nr.	Spezies (größte Ähnlichkeit) Accession Nr. (GenBank)	Phylogenetische Gruppe	%
9	<i>Roseobacter</i> sp. RED68 AY136132.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales</i>	97%
10	<i>Roseobacter</i> sp. PIC-68 AJ534238.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	100%
11	<i>Vibrio pommerensis</i> AJ580582.	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae</i>	90%
15	<i>Owenweeksia hongkongensis</i> AB125062.	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Cryomorphaceae</i>	90%
17	<i>Sulfitobacter pontiacus</i> AY159887.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	100%
20	<i>Oceanospirillum pusillum</i> AB006768	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methylocystaceae</i>	98%
23	<i>Roseobacter</i> sp. DSS-8 AF098493.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	92%
27	<i>Roseobacter</i> sp. YSCB-1 AY690598.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales</i>	99%
30	<i>Azospirillum amazonense</i> Z29616	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae</i>	93%
31	<i>Thalassospira lucentensis</i> AF358664	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae</i>	94%
32	<i>Microbacterium schleiferi</i> Y17237	<i>Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae</i>	100%
33	<i>Roseovarius crassostreae</i> AF114484.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	98%
36	<i>Marinomonas aquimarina</i> AJ843077	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales</i>	85%
44	<i>Marinilabilia salmonicolor</i> M62422	<i>Bacteroidetes; Bacteroidetes (class); Bacteroidales; Rikenellaceae</i>	88%
45	<i>Alcanivorax borkumensis</i> Y12579.	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales</i>	100%
47	<i>Desulfovibrio</i> sp. HS2 AY274444	<i>Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae</i>	95%
48	<i>Ruegeria</i> sp. SDC-1 AY265806	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	92%
49	<i>Spirochaeta</i> sp. AB015808.	<i>Spirochaetes; Spirochaetales; Spirochaetaceae</i>	87%
54	<i>Roseobacter</i> sp. DSS-8 AF098493	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	98%
59	<i>Azospirillum amazonense</i> Z29616	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae</i>	91%
60	<i>Thalassospira lucentensis</i> AF358664	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae</i>	99%
64	<i>Erythrobacter citreus</i> AF118020.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae</i>	93%
66	<i>Roseovarius crassostreae</i> AF114484.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	98%
69	<i>Thalassospira lucentensis</i> AF358664	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae</i>	97%
70	<i>Salegentibacter mishustinae</i> AY576653	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae</i>	93%
72	<i>Cellulophaga lytica</i> AB032512	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae</i>	92%
73	<i>Alcanivorax borkumensis</i> Y12579.	<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales</i>	100%
75	<i>Thalassospira lucentensis</i> AF358664	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae</i>	97%
76	<i>Sulfitobacter pontiacus</i> AY159887.	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	100%
78	<i>Chryseobacterium</i> sp. UOF CM895 AY468453.	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae</i>	97%
81	<i>Spirochaeta</i> sp. AB015808	<i>Spirochaetes; Spirochaetales; Spirochaetaceae</i>	87%
90	<i>Thalassospira lucentensis</i> AF358664	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae</i>	98%

Es stellt sich angesichts dieser Ergebnisse somit die Frage, welche anderen Mikroorganismen ebenfalls eine Rolle beim Ölabbau spielen. In diesem Zusammenhang sind die Mikrokosmen 15, 19, 21 und 25 von besonderem Interesse, da in ihnen eine starke Emulsionsbildung und parallel dazu ein Abbau von Kohlenwasserstoffen stattfinden. Zwei Mikroorganismen bzw. Operational Taxonomic Units (OTUs), die hierfür in Frage kommen, weisen in den besagten Mikrokosmen die intensiven Banden 31, bzw. 69 sowie die Banden 39, bzw. 81 auf.

Die DNA-Sequenzen der erstgenannten Banden wiesen dabei eine 94%tige bzw. 97%tige Ähnlichkeit zu *Thalassospira lucentensis* auf. Dieses Bakterium zählt zu den *Alphaproteobacteria*, genauer gesagt zur Familie *Oceanospirillaceae*. *T. lucentensis* verwertet hauptsächlich einfache Zucker⁸⁹. Zwei Studien haben gezeigt, dass dieses Bakterium keine Kohlenwasserstoffe verwerten kann, jedoch relativ häufig in ölverschmutzten Habitaten auftritt^{90, 91}. Die OTU, welche die Banden 39 und 81 verursacht besitzt eine 87%tige Ähnlichkeit der 16S rDNA zu einem Isolat der Gattung *Spirochaeta*. Die Anwesenheit dieses Organismus ist relativ überraschend, da Spirochäten in der Regel in anaeroben Habitaten oder aber parasitisch oder symbiotisch mit Muschelkiemen im Meer vorkommen. Die Stoffwechselvielfalt innerhalb der *Spirochaetales* ist jedoch relativ groß, so sind einige Arten zur Methanogenese fähig, andere wurden in Zusammenhang mit dem Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen gefunden. Eine Isolierung und Kultivierung dieses Organismus mit verschiedenen Medien sowie aromatischen Kohlenwasserstoffen schlug jedoch fehl.

Neben diesen den oben genannten Banden ist vor allem die große Anzahl an Banden im oberen Teil der DGGE-Profile der Mikrokosmen 15, 19, 21 und 25 besonders auffällig. Da diese Banden eine geringe Intensität haben und somit wenig DNA enthalten und darüber hinaus sehr dicht beieinander liegen konnten nur wenige dieser Banden identifiziert werden. So handelt es sich bei den Banden 15, 44, 70, 72 und 78 um Vertreter der *Bacteroidetes*, bzw. der *Flavobacteria*. Die DNA-Sequenz in Bande 72, welche in den Mikrokosmen 21 und 25 zu erkennen ist, hat eine 92%tige Ähnlichkeit zu dem Flavobakterium *Cellulophaga lytica*. Die Anwesenheit dieses Organismus ist auf die ausgedehnten Tang-„Wälder“ von *Laminaria sp.* und anderen Braun- und Grünalgen, die sich am Helgoländer Felssockel befinden, zurückzuführen⁹³. Möglicherweise sind diese Bakterien in der Lage, Bestandteile der Biofilme auf dem Öl sowie Ölbindemittel oder des Bindemittels selbst angreifen und verwerten. Eine weitere intensive Bande, die in Verbindung mit dem Ölbindemittel und Nährstoffen in Mikrokosmos 19 auftritt, ist die Bande 47. Die DNA-Sequenz des zu dieser Bande gehörigen Organismus hat eine hohe Ähnlichkeit mit *Desulfovibrio sp.*. Dieser Vertreter der Deltaproteobakterien kann unter anaeroben Bedingungen Schwefelverbindungen, größtenteils Sulfate reduzieren.

In der Tat gibt es weitere Hinweise auf Organismen, die Schwefelverbindungen nutzen. So wies die DNA-Sequenz der Banden 17 und 76 eine hohe Ähnlichkeit zu *Sulfitobacter pontiacus* auf. Dieser Vertreter wurde, wie viele andere Vertreter der *Alphaproteobacteria*, häufig in Meerwasserproben gefunden^{92, 94}, und scheint eine wichtige Rolle im Schwefelkreislauf des Meeres zu spielen. Die Banden 17 und 76 treten sowohl in den Mikrokosmen 14, 15, 21, 24 und 25 auf. Die Abundanz dieser Schwefelverbindungen verwertenden Bakterien ist durch die besondere chemische Zusammensetzung des Bunker-C – Schweröls zu erklären, welches bis zu 0,5% (w/w) Schwefel oder schwefelhaltige Verbindungen enthält.

Da es sich bei den oben genannten Spirochäten und den Vertretern der Desulfovibrionen mehrheitlich um anaerobe Bakterien handelt, ist es nicht auszuschließen, dass es Phasen oder Nischen in den Mikrokosmen gibt, in denen anaerobe Bedingungen vorliegen. Wie in den Abbildungen 3.4a – d hervorgeht, liegen in den Mikrokosmen häufig innerhalb der ersten zwei Wochen zum Teil Sauerstoffkonzentrationen zwischen 2 und 4 mg/l vor. Allerdings treten die Banden 47 und 81 hauptsächlich in der dritten und sechsten Woche auf. Da sowohl die Banden 47, 49 und 81 in Mikrokosmen mit Zugabe von X-Oil auftreten, besteht die Möglichkeit, dass sich im oder an der Oberfläche des Ölbindemittels in der Folge der mikrobiellen Aktivität anaerobe Bereiche oder solche mit sehr geringem Sauerstoffgehalt ausbilden.

Für eine genauere Einordnung der ermittelten DNA-Sequenzen wurden phylogenetische Bäume aller Sequenzen im Vergleich mit bekannten DNA-Sequenzen mariner Mikroorganismen hergestellt. Dabei wurden die DNA-Sequenzen der Banden aus Mikrokosmen, die auf Meerwasser basieren (Mikrokosmen 14, 15, 18, 19) sowie von solchen, die mit *A. borkumensis* angereichertes Meerwasser enthalten (Mikrokosmen 20, 21, 24, 25) in zwei getrennten phylogenetischen Bäumen aufgetragen.

Wie aus den phylogenetischen Bäumen in den Abbildungen 3.9a und b hervorgeht, ist die Mehrzahl der in den DGGE-Profilen identifizierten Organismen den *Alpha*- sowie *Gammaproteobacteria* und der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe (CFB) zuzuordnen. Wie bereits oben erwähnt gehören die meisten Mitglieder der natürlichen mikrobiellen Mikroflora des Meeres zu den *Alphaproteobacteria* sowie der CFB^{92, 93, 94}. Besonders häufig treten dabei sowohl in nährstoffversorgten wie auch unbehandelten Mikrokosmen Verwandte oder Vertreter der Gattung *Roseobacter* auf. Allein sieben der oben aufgeführten OTUs sind relativ eng mit dieser Bakteriengattung verwandt.

Neben Vertretern der *Roseobacteriaceae*, konnten solche der Gattungen *Thalassospira*, *Sulfitobacter*, *Terasakiella*, *Erythrobacter* und *Azospirillum* nachgewiesen werden. Es ist jedoch auffällig, dass innerhalb der nährstoffversorgten Mikrokosmen eine höhere Vielfalt an Vertretern der *Alphaproteobacteria* vorliegt als in den unbehandelten.

Im Gegensatz zu den *Alphaproteobacteria* sind nur sehr wenige verschiedene ebenfalls häufig in Meerwasser anzutreffende *Gammaproteobacteria* identifiziert worden. So sind beispielsweise Vertreter der Gattung *Vibrio*, *Pseudomonas* und *Alteromonas* in Meerwasserproben weit verbreitet⁹⁵. Darüber hinaus sind aber auch viele der marinen ölabbauenden Mikroorganismen – auch hydrocarbonoclastische Bakterien (HCB) genannt – Mitglieder dieser Gruppe. In zahlreichen Publikationen wurden mittels quantitativer FISH-Analysen häufig die Beobachtung gemacht, dass sich im Falle einer Ölverschmutzung des Meeres die mikrobiellen Gemeinschaften von einer zahlenmäßig durch Alphaproteobakterien und CFB dominierten zu einer durch Gammaproteobakterien dominierten Gemeinschaft verschiebt^{27, 37, 53}. Durch die DGGE-Analysen wurde ein Vertreter der Vibrionen, ein Verwandter der *Pseudomonadaceae* sowie *Alcanivorax borkumensis* entdeckt, jedoch keine weiteren Vertreter der hydrocarbonoclastischen *Gammaproteobacteria*, identifiziert.

Wie bereits oben erwähnt erscheinen in den besagten beiden Mikrokosmen relativ viele Banden im oberen Bereich der Gele. Es handelte sich dabei um die Banden 15, 44, 70, 72 und 78, die den den *Flavobacteria*, insbesondere der Gattung *Cytophaga* zugeordnet werden konnten.

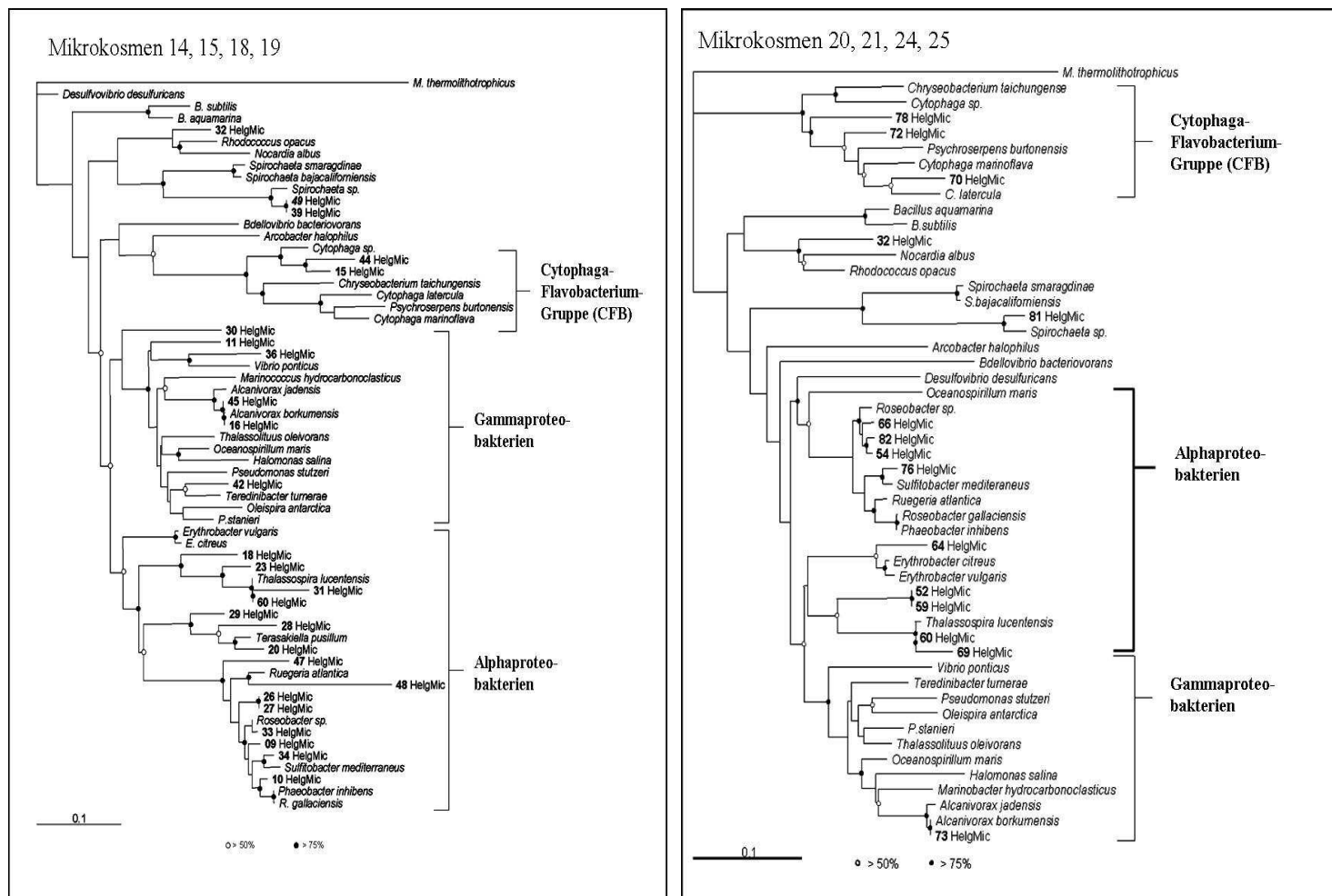


Abb. 3.9a und b: Phylogenetischer Baum der DNA-Sequenzen der aus den in Abb. 3.8a und b präsentierten DGGE-Gelen extrahierten Banden. Zur Verifizierung des phylogenetischen Baumes wurde ein Bootstrapping durchgeführt, in dessen Verlauf 100 verschiedene Bäume generiert wurden. Der Baum mit der optimale Ausrichtung aller Äste (consensus tree) wurde mittels einer Subroutine des Programms Phylip bestimmt und abgebildet. Die die prozentuale Angabe der Bootstrap values – der prozentualen Wahrscheinlichkeit der Ausrichtung zweier Äste wird im Diagramm mittels Kreisen an den Verzweigungen angegeben. Schwarze Kreise geben einen Bootstrap value von 75% bis 100%, weisse Kreise einen solchen Wert von 50 – 75% an. Die Referenzsequenzen wurden der Datenbank GenDB entnommen und ein Alignment mit den Sequenzdaten der einzelnen Proben durchgeführt.

Zwei weitere Organismen, welche in mehreren Mikrokosmen auftreten, wurden durch die Banden 32 sowie 31, 69 und 81 identifiziert. Im letzteren Fall handelt es sich um eine bisher nicht kultivierte und nicht beschriebene Spirochäte. Die Bande 32 konnte *Microbacterium schleiferii* zugeordnet werden. Dieses *Actinobacterium* ist wie in den Abb. 3.9a und b erkennbar verwandt mit der Gattung *Rhodococcus*, deren Vertreter für ihre Fähigkeit, vielfältige Kohlenwasserstoffe als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können, bekannt sind. Da Kultivierungsversuche mit aromatischen Kohlenwasserstoffen als Substrat fehlschlagen, besteht die Möglichkeit, dass der Abbau der aromatischen Bestandteile des Bunker C – Schweröls durch unkultivierbare Mikroorganismen stattfindet oder diese Organismen nicht durch die Extraktion der DGGE-Banden erfasst wurden.

3.9 Mesokosmenstudie

Ausgehend von den Erfahrungen der Mikrokosmenstudie sollten in einem um den Faktor 1000 größeren Mesokosmenversuch in einem Becken mit 500 Litern Volumen wichtige Informationen für die Entwicklung einer biotechnologischen Lösung für das Problem Ölverschmutzung im Meer gesammelt werden. Das primäre Ziel des Versuches war die möglichst effektive Entfernung einer Ölverschmutzung in den Mesokosmenbecken unter Verwendung experimenteller Prototypen einer Schwimmbarriere sowie von schwimmenden Matten aus Ölbindemitteln. Kernpunkt dieser Anwendung war daher das Ölbindemittel X-Oil, dass – in einem öldurchlässigen Hüllmaterial verpackt und mit Schwimmkörpern an der Oberfläche schwimmend – Schweröl aus der Wassersäule entfernen sollte. Durch diese Bindung sollte der Schadstoff zunächst aus der Wassersäule entfernt und sekundär auf der Oberfläche des Ölbindemittels durch Bakterien abgebaut werden.

In dieser biotechnologischen Anwendung sollten mehrere Probleme vorangegangener Versuche zum Ölabbau gelöst werden; so wurde durch Zugabe eines industriellen Langzeitdüngers die Ausschwemmung und Verdünnung der essentiellen Nährstoffe, die Ausschwemmung von eingebrachten Mikroorganismen hingegen durch die Zugabe von Ölbindemittel, auf dem Biofilme von *A. borkumensis* angezüchtet wurden, verhindert. Der Erfolg des Versuches sollte an der Unbedenklichkeit des Abwassers des Versuches bemessen werden

3.10 Mesokosmenstudie - Allgemeine Beobachtungen:

Im Laufe des Versuches wurden wie oben beschrieben drei Mesokosmenbecken von je 500 l Volumen eingesetzt. Das erste Becken wurde mit Meerwasser befüllt, eine ringförmige experimentelle Schwimmbarriere in das Meerwasser gegeben und 2,5 l auf 60° C erhitztes Schweröl hinzugegeben. Dabei wurde etwa die Hälfte des Öls direkt auf die Barriere, die andere Hälfte in den Innenraum der Barriere gefüllt. Abb. 3.10a zeigt das Mesokosmenbecken I zehn Tage der Zugabe des Öls.

Während der ersten vier Tage war ein intensiver Geruch von aromatischen Kohlenwasserstoffen wahrzunehmen, der innerhalb der folgenden sieben Tage nachließ und am Versuchstag 12 nicht mehr wahrgenommen werden konnte. Im Mesokosmenbecken II, welches nach 28 Tagen aus der Mesokosmenflüssigkeit des ersten Beckens hergestellt wurde, konnte kein Ölgeruch bemerkt werden.

Im Mesokosmenbecken I kam eine schwimmende Ölbarriere zum Einsatz, die zunächst auf dem Wasser trieb, danach jedoch im Wasser einsank, ohne komplett zu versinken. Über den ganzen Versuch blieb die Barriere an der Oberfläche und umschloss einen Bereich, in den das Öl eingefüllt wurde. Durch Störung der Barriere infolge der Probennahmen ist jedoch wie in Abb. 3.10a zu erkennen im Laufe des Versuches ein Teil des Schweröls aus der Barriere ausgetreten. Dieses Öl wurde, da es nicht in Kontakt mit der Barriere kam, nicht von dieser adsorbiert. Das noch innerhalb der Barriere befindliche Öl sowie jenes, welches direkt auf die Barriere gegeben wurde, sind zum größten Teil in den Innenraum der Barriere vorgedrungen und wurden durch das X-Oil gebunden. Ein kleinerer Teil des Öls wurde von dem Hüllstoff, der aus saugfähigen Polypropylenfasern bestand, aufgenommen und verblieb in diesem Hüllmaterial. Die Menge an frei auf der Oberfläche des Mesokosmos befindlichen Bunker C – Öl nahm im Lauf des Versuches immer mehr ab.



Abb. 3.10a (l.) und b (r.): Mesokosmenbecken I (r.) nach zehn Tagen Versuchsdauer (Versuchstag 10);
Mesokosmenbecken II (NKB) nach zehn Tagen Versuchsdauer (Versuchstag 38)

Parallel dazu konnte eine Verfärbung des Mesokosmenwassers in Mesokosmos I beobachtet werden. Die Färbung trat zuerst nach sechs Tagen auf und intensivierte sich im Laufe des Versuches. Dieser Effekt ging dabei auf zwei Komponenten zurück: die war zum einen eine bräunliche Verfärbung durch niedermolekulare Farbstoffe des X-Oils, die relativ früh einsetzte und sich über den Versuchsablauf nicht reduzierte. Die zweite Komponente war wie auch im Falle der Mikrokosmen beobachtet, eine intensive Emulsionsbildung des Bunker C – Schweröls. Die Emulsifikation setzte im Mesokosmenbecken I deutlich erkennbar nach acht Tagen ein. Im Vergleich zu den Mikrokosmen waren zunächst sehr große Micellen bzw. Öltröpfen mit einem Durchmesser von wenigen Millimetern bis zu einem halben Zentimeter zu erkennen.

Der Durchmesser reduzierte sich bis zum Versuchstag 21 hin bei gleichzeitiger Erhöhung der Anzahl der Micellen, wodurch eine Bildung einer sehr feinen Emulsion auftrat. Nach 28 Versuchstagen trat versuchsbedingt eine Verdünnung der Emulsion auf. Im Mesokosmenbecken I wurde in der Folge die Emulsionsbildung verstärkt, während im Mesokosmenbecken II zwar eine bräunliche Verfärbung des Wassers durch das X-Oil in den Schwimmmatten eintrat, die Emulsion hingegen deutlich weniger Micellen und Öltröpfchen enthielt. Ab dem Versuchstag 42 waren bei Probennahmen in einem Liter Mikrokosmenflüssigkeit weder mit bloßem Auge noch mikroskopisch sichtbare Rückstände der Emulsion erkennbar. Jedoch waren an der Unterseite der Schwimmmatten schwarze Verfärbungen zu erkennen, die auf an die Schwimmmatten gebunden Öltröpfchen zurückzuführen waren. Zeitweise konnte zwischen den Versuchstagen 28 und 35 im Mesokosmos II eine starke Schaumbildung beobachtet werden.

Eine ähnliche Beobachtung war im Mesokosmenbecken zwischen den Versuchstagen 28 und 56 nicht zu machen, jedoch nahm auch hier nach einer kurzfristigen starken Emulsionsbildung zwischen Versuchstag 28 und 35 die Konzentration der Micellen und Öltröpfchen nach und nach ab. Im Laufe der starken Emulsionsbildung gingen die Rückstände des freien Öls an der Oberfläche des Beckens I in der Mesokosmenflüssigkeit in Emulsion, wurden gebunden oder sanken möglicherweise zum Boden des Beckens ab, so dass kein freies Öl mehr im Mesokosmos erkennbar war.

Mit dem Versuchstag 56 endete die Beprobung und mikrobiologische Analyse der Mikrokosmen. Die Schwimmbarriere und die Schwimmmatten wurden entfernt und entsorgt.

Im Verlaufe der abschliessenden Sandfiltration zur Aufbereitung der entstandenen Abwässer war kurzfristig ein säuerlicher Geruch aus dem Sandfilterbecken wahrnehmbar. Nach 28 Tagen im Sandfilterbecken wurde die Mesokosmenflüssigkeit mittels Indikatorpapier für Kohlenwasserstoffe (Merk, Darmstadt) überprüft. Dieses Indikatorpapier verfärbt sich in Anwesenheit von Kohlenwasserstoffen in Konzentrationen von > 9 mg/l von hellblau auf dunkelblau bis schwarz. Im Falle der Mesokosmenflüssigkeit sowie der Flüssigkeit im Becken II wurden keine Kohlenwasserstoffe nachgewiesen. Nach Überprüfung der Toxizität mittels des ARTOX-Kit M (Strategic Diagnostics Inc., Newark, Delaware, USA) wurde die Mesokosmenflüssigkeit über eine Abwasserleitung in die Nordsee abgelassen.

3.11 Mesokosmenstudie – Verlauf der Sauerstoffkonzentrationen

Um möglichst konstante aber realistische Bedingungen für die Versuche zu schaffen, wurden die Mesokosmenbecken in einem temperierten Raum bei 18°C gelagert und konstant mit Druckluft belüftet. Das Meerwasser vor der Insel Helgoland wies im selben Zeitraum Temperaturen zwischen 17,5 und 22°C, sowie 9 – 10 mg/l gelösten Sauerstoffs auf.

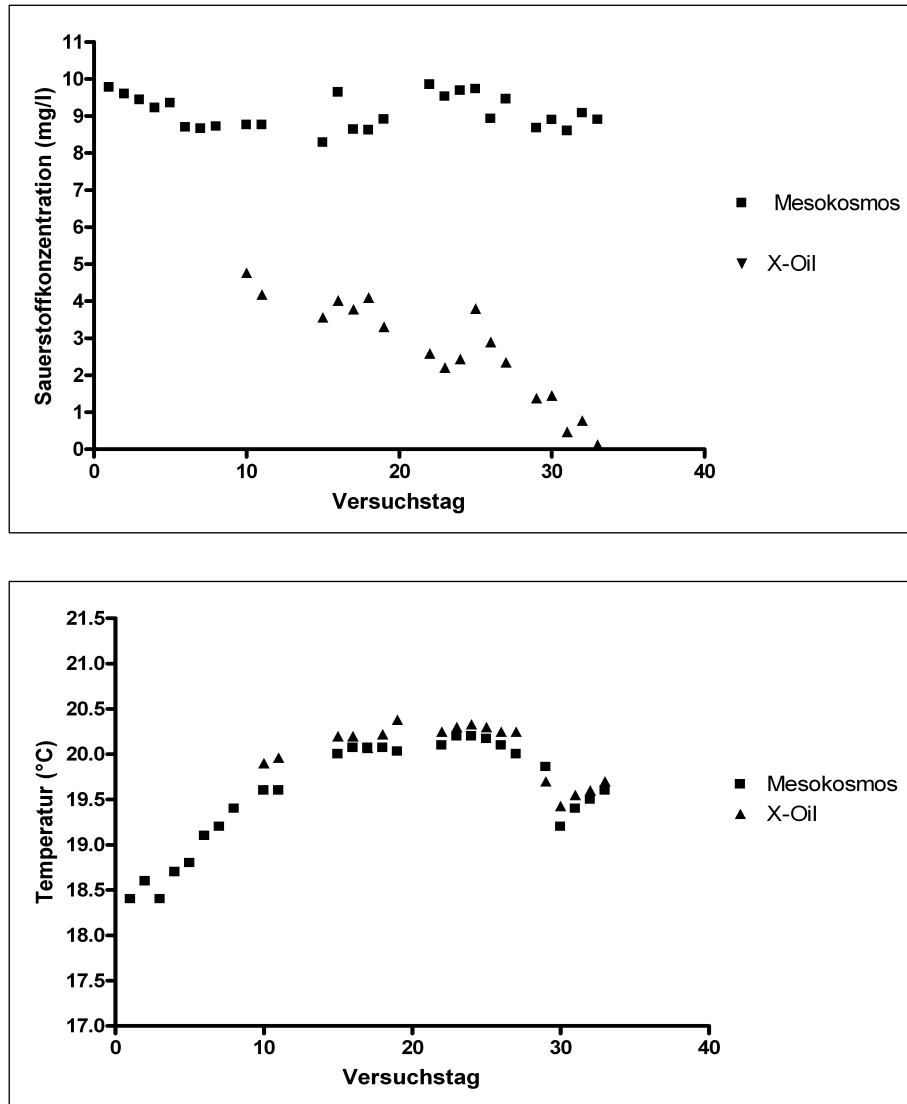


Abb. 3.11a (oben) und b (unten.): Sauerstoffkonzentrationen (o.) und Temperaturverlauf (u.) im Mesokosmenbecken I sowie in den Schwimmbarrieren im Verlauf der ersten 33 Versuchstage. Für die X-Oil-Barrieren konnten innerhalb der ersten acht Tage wegen der starken Ölverschmutzungen der Barrieren keine Messungen durchgeführt werden.

Abb. 3.11a zeigt exemplarisch die Verläufe der Sauerstoffkonzentrationen in der Mesokosmenflüssigkeit sowie in der Schwimmbarriere. In der Schwimmbarriere konnten aufgrund der starken Kontamination mit Schweröl erst nach einigen Versuchstagen Sauerstoff- und Temperaturmessungen gemacht werden.

Wie im Diagramm zu erkennen ist, bleibt die Sauerstoffkonzentration trotz einiger Schwankungen relativ konstant zwischen acht und zehn mg/l. Somit bestand durch die konstante Zufuhr von Druckluft in den Mesokosmenbecken jederzeit eine ausreichende Belüftung und die Sauerstoffkonzentration blieb ähnlich hoch wie im Meerwasser. In den Schwimmbarrieren hingegen ist vom Beginn der Messungen am Tag 8 an ein stetiges Absinken der Sauerstoffkonzentration zu verzeichnen.

Es ist davon auszugehen, dass zu Versuchsbeginn in den Schwimmbarrieren Meerwasser mit einer ähnlich hohen Menge an gelöstem Sauerstoff wie in der Mesokosmenflüssigkeit von circa 9 bis 10 mg/l vorlag. Im Laufe der ersten acht Versuchstage muss diese Sauerstoffkonzentration um 50% gesunken sein. Zwischen dem Versuchstag acht und 33 sank die Konzentration gelösten Sauerstoffs weiter und erreicht an den Tagen 31 bis 33 Werte von unter einem mg/l. Somit liegt in den Barrieren infolge eines möglicherweise biologischen Sauerstoffverbrauches ein anaerobes Milieu vor. Dieser massive Verbrauch von Sauerstoff zeigt ferner, dass die Versorgung mit Sauerstoff durch Diffusion ungenügend ist. Da der biologische Abbau von Kohlenwasserstoffen in erheblichem Masse vom Sauerstoff abhängig ist, bedeutet dies, dass nach circa vier Wochen kein aerober Abbau von Öl innerhalb der Schwimmbarriere mehr möglich war. Zwar sind auch anaerobe Abbauprozesse von Kohlenwasserstoffen, beispielsweise unter Verwendung von Sulfaten als Elektronenendakzeptoren und Sauerstofflieferanten, bekannt, jedoch laufen diese Prozesse nur in bestimmten anaerobe Habitaten und sehr viel langsamer ab als der oxidative Abbau⁹⁶.

Der zweite Faktor, der für den Ölabbau entscheidend ist, ist die Wassertemperatur. Für die Mesokosmenversuche wurde die am Versuchstag im Meerwasser vorliegende Temperatur von 18°C gewählt und die Mesokosmen in einem entsprechend temperierten Raum inkubiert. Erstaunlicherweise steigen die Temperaturen im Mesokosmos nach dem Versuchsbeginn relativ schnell bis auf Werte um 20,5°C an, sinken danach ab, um nach dem Versuchstag 28 wieder anzusteigen. Die Innentemperatur von Schwimmbarriere und die Wassertemperatur des Mesokosmos verlaufen dabei relativ gleichmässig. Diese Erwärmung konnte zurückgeführt werden auf die Druckluftzufuhr: im fraglichen Zeitraum auf Helgoland Aussentemperaturen von 30 – 35°C herrschen, wurde bereits warme Luft durch das Druckluftaggregat angesaugt und über diese Luft das Becken aufgewärmt. Aufgrund eines Ausfalls des Messgerätes konnten nach dem Versuchstag 33 keine weiterführenden Messungen von Sauerstoffkonzentration oder Temperatur durchgeführt werden.

3.12 Mesokosmenstudie - Mikroskopische Beobachtungen

Analog zu den mikroskopischen Untersuchungen der Mikrokosmenversuche wurden Stichproben aus der Mesokosmenflüssigkeit sowie vom ölkontaminierten X-Oil täglich licht- sowie phasenkontrastmikroskopisch untersucht.

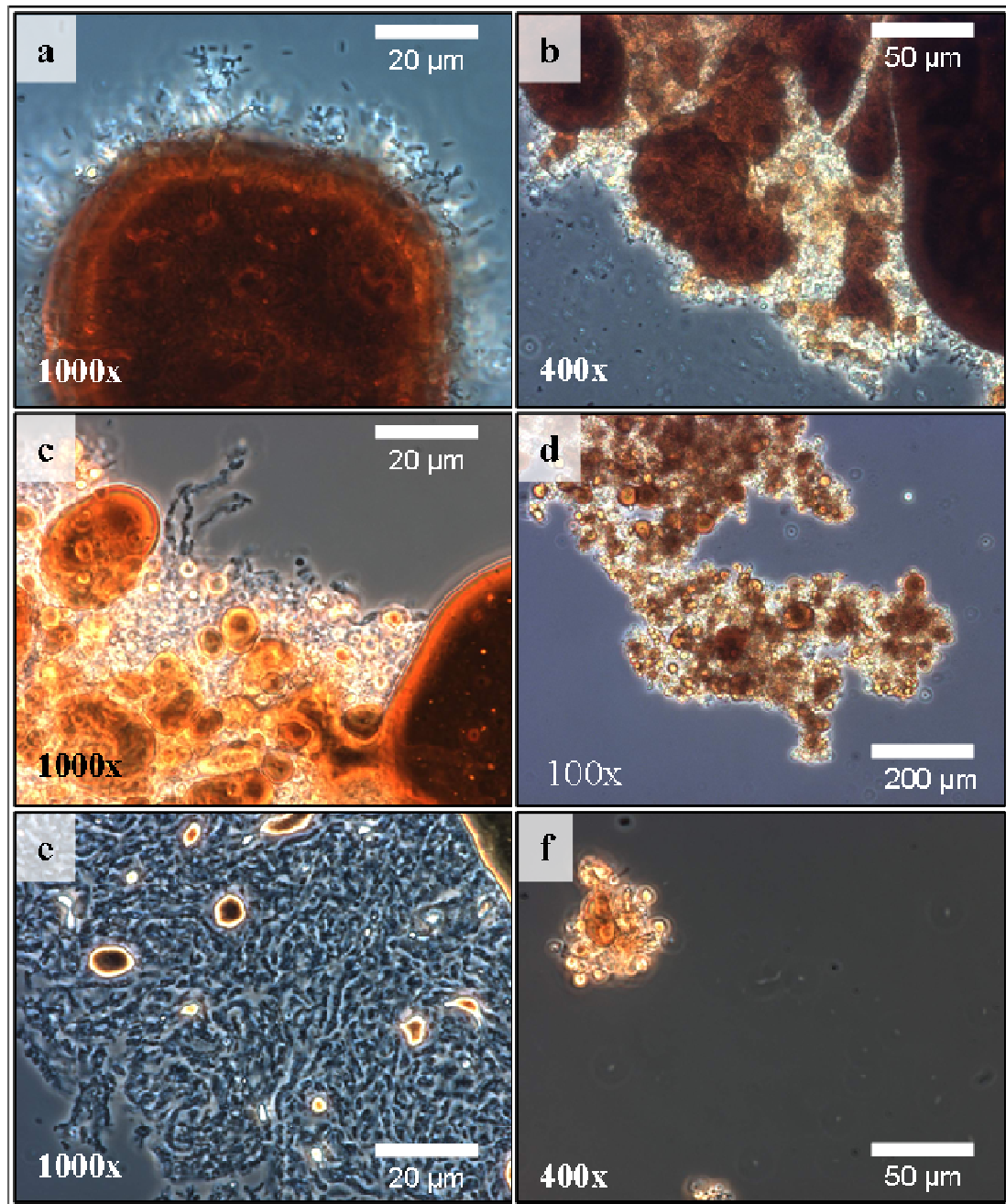


Abb. 3.12 a-f: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Probenmaterial aus dem Mesokosmenbecken I; sämtliche Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axioskop und der der Axiocam Software angefertigt. In der oberen linken Ecke ist jeweils die Bezeichnung des Bildes, in der unteren linken Ecke der Vergrößerungsfaktor und in der oberen bzw. unteren rechten Ecke ein Referenzbalken angegeben. Abb. 3.12 a zeigt eine Micelle aufgenommen am 24. Versuchstag, die Abb. 3.12 c einen Biofilm an Versuchstag sieben, Abb. 3.12 e einen Biofilm am Versuchstag 14, die Abbildungen 3.12 b und d Biofilm-Aggregate am Versuchstagen 23. In der Abbildung 3.12 f ist ein Rückstand des Biofilms am Versuchstag 28 zu erkennen.

Die Abbildungen 3.12 a-f zeigen ähnliche Anzeichen der Aktivität ölabbauender Mikroorganismen, wie sie auch im Falle der Mikroskopenstudie in den Abbildungen 3.2 a – e dokumentiert wurden. Abb. 3.12 a zeigt einen Öltropfen bzw. eine Micelle, auf deren Oberfläche sich kurze, stäbchenförmige Bakterien befinden und dichte Ansammlungen bilden. Am linken Bildrand ist eine Ansammlung von Zellen zu erkennen, die von einer im Bild hell erscheinenden Matrix umgeben wird. Ähnliche Beobachtungen konnten über den gesamten Versuchsablauf gemacht werden.

Abb. 3.12 c zeigt die Oberfläche eines dicht bewachsenen Öltropfens am siebten Versuchstag. Es ist deutlich das bräunliche Schweröl zu erkennen, welches an der Oberfläche in kleine Micellen aufgespalten, jedoch von einer dichten Matrix umgeben ist. In der Matrix sowie auf dessen Oberfläche sind gelegentlich einzelne Bakterienzellen zu erkennen.

Fälle der Abb. 3.12 a sind kurze stäbchenförmige Bakterien zu erkennen, die in Form langer Ketten wachsen. Die Dicke der Schicht dieses Biofilms beträgt circa 20 – 30 µm. Auf den Abbildungen 3.12 b und d sind Übersichtsbilder der Biofilmaggregate zu erkennen, die am Versuchstag 23 aufgezeichnet wurden. Abb. 3.12 b zeigt dabei einen Öltropfen, der nur teilweise in Biofilm eingehüllt ist und aus relativ großen Öltröpfchen besteht. 3.12 d zeigt hingegen ein großes Biofilm-Aggregat, in dem eine große Anzahl kleiner Micellen durch eine dichte Schicht Biofilm vollständig umschlossen ist. Eine ähnliche Beobachtung konnte bereits im Falle der Mikroskopen gemacht werden und ist in Abb. 3.2 b gezeigt. Es liegt nahe, dass sich es sich bei dem Biofilm in Abb. 3.12 d um ein späteres Stadium des mikrobiellen Abbaus von Öl als bei dem in 3.12 b dokumentierten handelt. Angesichts der Abbildungen ist es wahrscheinlich, dass die Aufspaltung des Öls in kleine Micellen auch nach dem Bewuchs durch den Biofilm weiter stattfindet. Abbildung 3.12 e stellt eine Nahaufnahme des Biofilms auf den Oberflächen des Öls nach 14 Tagen Versuchsdauer dar. Der Biofilm hat im Vergleich zu Abbildung 3.12 c eine Dicke von über 100 µm. Dabei ist keine dichte Matrix zu erkennen, sondern vielmehr eine enorme Zahl an stäbchenförmigen Bakterien, die dicht gedrängt in Form langer Ketten oder Spiralen wachsen. Ein ähnliches Bild ist in Abb. 3.12 c zu erkennen. In der Abbildung 3.12 f vom Versuchstag 28 ist ein relativ kleiner Biofilmbrocken, der aus nur wenigen sehr kleinen Micellen besteht, welche durch eine Matrix zusammengehalten zu werden. Im Mesokosmenbecken I wurden innerhalb der ersten zwei Wochen hauptsächlich einzelne Micellen und Biofilme wie in Abb. 3.12 b beschrieben beobachtet. Zwischen Tag 14 und 28 machten die in Abb. 3.12 b und d gezeigten Biofilme die Mehrzahl der Bestandteile der Emulsion aus. In den Mesokosmen I und II traten ab dem Tag 28 tendenziell häufiger Biofilme wie in Abb. 3.12 f auf als die in 3.12 b oder d abgebildeten.

Obwohl in der Regel ein Gemisch dieser unterschiedlichen Biofilme und Micellen in beiden Mesokosmenbecken vorliegt, scheint dennoch gewissermassen ein phasenweiser Abbau des Öls vorzuliegen: Anfangs heften sich Bakterien an die Oberfläche des Öls an. Nach dem Kontakt scheint unter den Versuchsbedingungen ein Wachstum in dessen Folge Öltropfen von bakterieller Zellmasse eingeschlossen werden.

Während oder nach dem Wachstum der Bakterien wird eine Matrix aus einem dichten biologischen Material gebildet, die das Öl weiter einhüllt; es bildet sich ein Biofilm. Unter der Schicht des Biofilms scheinen die Emulsionsbildung und das Bakterienwachstum fortgesetzt zu werden, bis die Öltropfen unter dem Biofilm in kleinere Micellen aufgespalten werden und diese Micellen ihrerseits von Biofilm eingeschlossen werden. In späten Phasen des Abbaus zerfallen die Biofilme und es bleiben sehr kleine Micellen mit Resten der Matrix zurück.

3.13 Mesokosmenstudie - Chemische Parameter: Nährstoffkonzentrationen

Wie in den oben beschriebenen Mikrokosmenversuche deutlich geworden ist, spielen Nährstoffzugaben eine entscheidende Rolle beim Ölabbau im Meer. Durch die sehr niedrigen natürlichen Nährstoffkonzentrationen in den Meeren wird der Abbau von Kohlenwasserstoffen sehr schnell durch die Verfügbarkeit von Stickstoff limitiert. Eine Ausnahme bilden jedoch Randmeere wie der Persische Golf oder die Ostsee, die durch Zuflüsse aus intensiver Landwirtschaft mit Düngemitteln belastet sind ¹⁶.

Im Gegensatz zu den Mikrokosmen, die zum Teil wöchentlich mit frischem, nährstoffhaltigem Medium versorgt wurden, kamen in den Mesokosmen Nährstoffe in Form eines industriellen Langzeitdüngers zur Anwendung. Der entscheidende Faktor hierbei ist die kontinuierliche und ausreichende Versorgung des Mesokosmos. Hierzu wurden im Vorfeld Mikrokosmenversuche im Maßstab 1: 1000 gemacht, welche zeigten, dass ein Verhältnis Osmocote zu Öl von 1:2 bis 2:1 hervorragende Ergebnisse in Bezug auf die Emulsionsbildung erbringt. Parallel zum Versuch wurden die Konzentrationen der Nährstoffe überwacht, um Nährstoffengpässe oder Eutrophierung während des Versuches zu erkennen. Ferner sollten anhand des Verbrauchs der einzelnen Bestandteile des Düngers Informationen über die bevorzugte Stickstoffquelle der mikrobiellen Gemeinschaften gewonnen werden, durch die eine bessere Wahl oder Modifikation des Düngers möglich wird.

Wie aus den Abbildungen 3.13a und b hervorgeht, sind über den gesamten Versuchsablauf in Mesokosmenbecken I und II ausreichend Nährstoffe vorhanden. Weder Ammonium und Nitrat als Stickstoff noch Phosphat als Phosphorquelle werden im Laufe des Versuches limitierend. Die Werte dieser Ionen liegen dabei bereits nach wenigen Tagen um mehr als den Faktor 10.000 höher als das zu Beginn des Versuches der Fall war. In dem Meerwasser, welches an Versuchstag 0 in das Mesokosmenbecken gegeben wurde, lagen 10,9 µmol/l Nitrat, 3,3 µmol Ammonium, 0,25 µmol/l Phosphat und 0,14 µmol/l Nitrit vor. Diese Werte liegen innerhalb der Normwerte, die für Meerwasser vor Helgoland zur Versuchszeit gemessen wurden. Im Laufe des Versuches wurden bis zu 24 mmol/l Ammonium, circa 10 mmol/l Nitrat und 400 µmol/l Phosphat gemessen. In der Regel ist festzuhalten, dass überwiegend Nitrat- und Ammoniumionen durch den Dünger freigesetzt werden, wobei Ammonium im Dünger in einer höheren Konzentration vorzuliegen scheint.

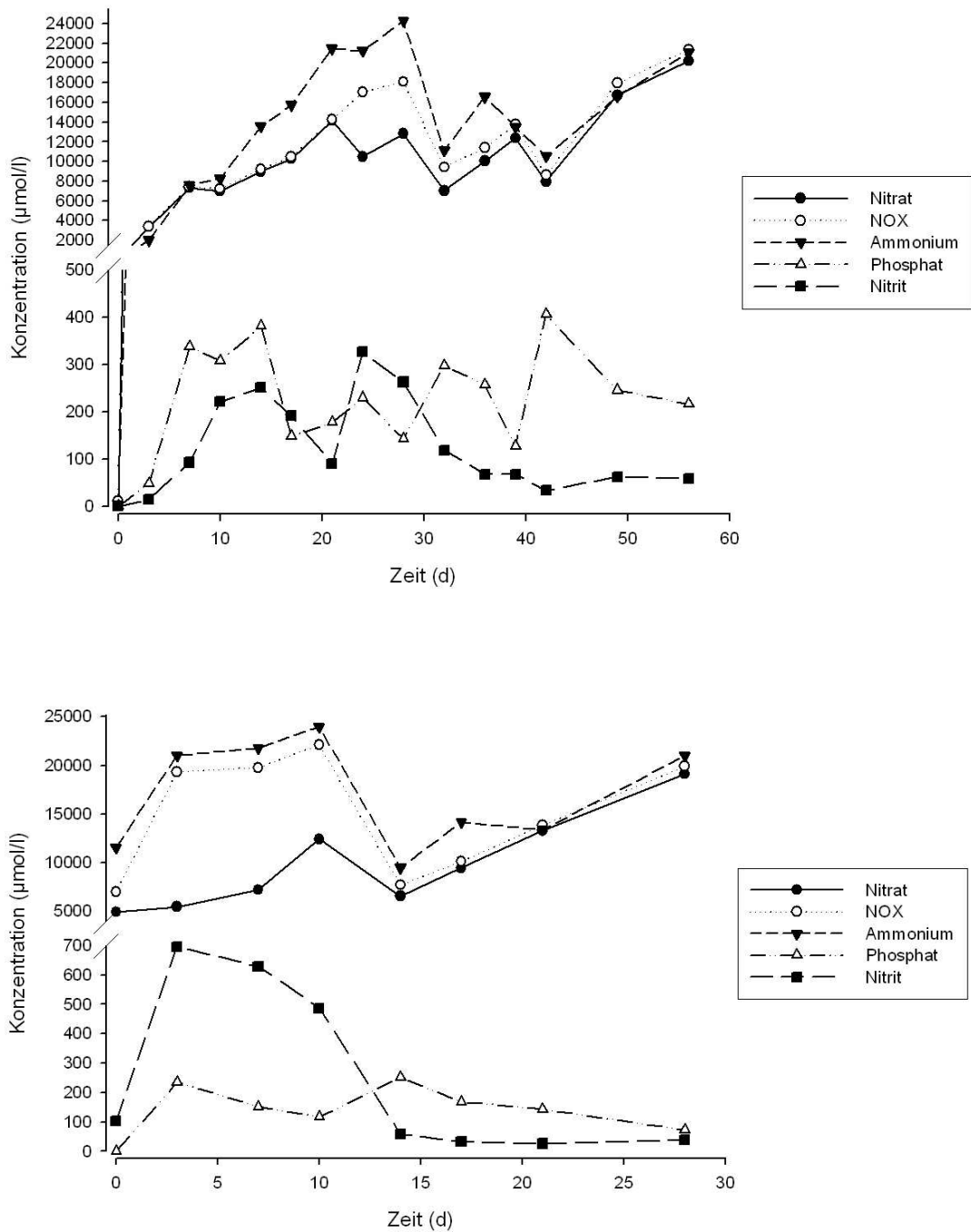


Abb. 3.13a (oben) und b (unten): Konzentration der Ammonium-, Nitrat-, Nitrit- und Phosphationen sowie der Gesamtkonzentration von Nitrat und Nitrit (NOX) im Mesokosmenbecken I (3.13a) von Versuchstag 0 bis 56 sowie im Mesokosmenbecken II (3.13b). Zu berücksichtigen ist die Verdünnung des Mesokosmos I am Tag 28 mittels frischen Meerwassers. Tag 0 des Mesokosmenbeckens II entspricht daher dem Versuchstag 28. In die Ergebnisse sind drei parallele Messungen eingeflossen. Die Mittelwerte wurden automatisch ohne Angabe einer Standardabweichung berechnet.

Die enorm hohen Konzentrationen der Nährstoffe zeigen, dass die zugegebene Düngermenge für die Mesokosmen mit 500 l Volumen nicht nur eine mehr als ausreichende Nährstoffversorgung bereitstellt, sondern darüber hinausgehend sogar eine Eutrophierung darstellt, da offensichtlich nur ein geringer Teil dieser Nährstoffe verwendet wird. So steigen die Konzentrationen von Ammonium und Nitrat innerhalb der ersten 28 Tage nahezu konstant an. Lediglich zwischen Tag acht und zehn sinkt

die Nitratkonzentration leicht. Nach der Teilung und Verdünnung des Mesokosmos kommt es im Mesokosmos I zwischen Tag 35 und 42, im Mesokosmos II am Tag 14 (Versuchstag 42) zu einem Absinken beider Konzentrationen. Die Phosphatkonzentrationen schwanken in beiden Mesokosmen um Werte zwischen 100 und 200 $\mu\text{mol/l}$.

Bemerkenswert ist das Auftreten von hohen Konzentrationen von Nitrit in den Mesokosmen: dabei treten in Mesokosmos I Nitritkonzentrationen von bis zu 400 $\mu\text{mol/l}$, in Mesokosmos sogar bis zu 700 $\mu\text{mol/l}$ auf. In beiden Mesokosmen tritt parallel zur Erhöhung der Nitritkonzentration ein Absinken (Mesokosmos I) oder eine Stabilisierung der Nitratkonzentration (Mesokosmos II) ein. In der Regel kam es nach einem kurzen sprunghaften Anstieg der Nitritkonzentration zu einem raschen Absinken und einer Stabilisierung der Konzentration bei circa 50 $\mu\text{mol/l}$.

Dies deutet an, dass in beiden Mesokosmen eine Denitrifikation stattfindet, bei der Nitrat stufenweise über Nitrit zu Stickstoff umgesetzt wird, welcher dann in Gasform aus dem Mesokosmos austreten kann. Denitrifikationsprozesse treten in der Natur häufig in Situationen auf, in denen eine Sauerstoffknappheit auftritt, oder dieser komplett verbraucht wird und sich ein anaerobes Milieu bildet. Da im Mesokosmenbecken I zumindest zwischen den Versuchstagen 0 bis 28 nachweislich eine mit Sauerstoff gesättigte Lösung mit 8 bis 10 mg/l gelösten Sauerstoffs vorlag, sind zwei Erklärungen dieses Prozesses möglich: So könnten lokale Bereiche mit einer sehr niedrigen Sauerstoffkonzentration vorliegen, in denen die biologische Aktivität unter Verwendung der Denitrifikation stattfindet. Zum anderen könnte ein Teil der mikrobiellen Gemeinschaft auf starke Respirationsraten mit einem Ausweichen auf die Verwendung alternativer Elektronenakzeptoren wie Nitrat reagiert, um einen Konkurrenzkampf um Sauerstoff zu vermeiden.

Um Aussagen über potenzielle Zusammenhänge zwischen den Nährstoffkonzentrationen und biologischer Aktivität machen zu können, müssen diese Ergebnisse mit den Ergebnissen von Zellzählungen gekoppelt werden.

3.14 Mesokosmenstudie - Chemische Parameter der Mesokosmen: pH-Wertmessungen

Parallel zu den Nährstoffmessungen wurde der pH-Wert der Probenlösungen, die für Bestimmung der Nährstoffe entnommen und filtriert wurden, mittels eines pH-Meters bestimmt.

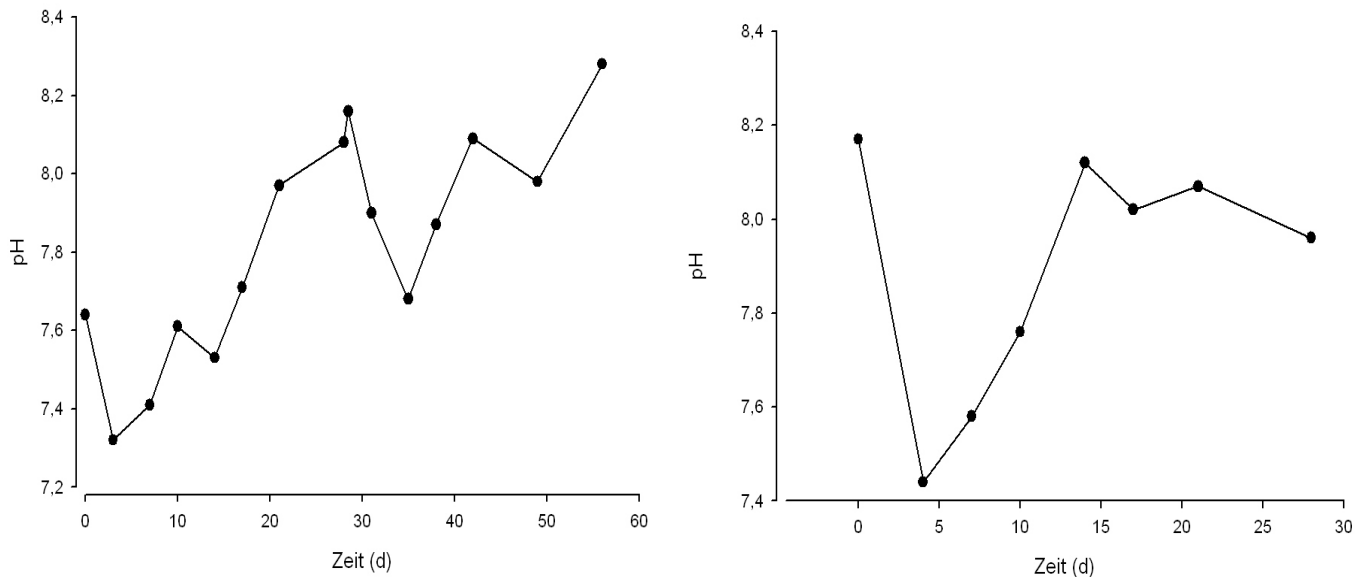


Abb. 3.14a (l.) und b (r.): pH-Werte der Mesokosmenflüssigkeit in Mesokosmos I (l.) und II (r.) über den Versuchsablauf. Zu berücksichtigen ist die Verdünnung des Mesokosmos I am Tag 28 mittels frischen Meerwassers. Tag 0 des Mesokosmenbeckens II entspricht daher dem Versuchstag 28.

Die ermittelten pH-Werte sind in den Abbildungen 3.14 a und b abgebildet. Der Mesokosmos I zeigt zu Beginn einen pH-Wert von 7,65, was sich innerhalb der Normwerte für Meerwasser (7,6– 7,8) bewegt. Nach kurzem Absinken des pH-Wertes bis Tag 3, erfolgt ein konstanter Anstieg des pH-Wertes, der nur durch am Tag 28 sowie in zwei kurzen Phasen an Tag 14 und Tag 42 unterbrochen wird. Infolge der Verdünnung des Mesokosmos fällt der pH-Wert um 0,5, wohingegen an den Tagen 14 und 42 nur leichte Senkungen um 0,05 stattfinden. Zum Ende des Versuches liegt ein pH von 8,3 vor, somit trat eine signifikante Steigerung um mehr als 0,7 vor.

Im Mesokosmenbecken II sinkt der pH-Wert nach der Verdünnung mit frischem Meerwasser auf 7,4, steigt aber innerhalb der nächsten 14 Tage sprunghaft an auf 8,15. Wiederum handelt es sich dabei um den Versuchstag 42. Ab diesem Zeitpunkt stabilisiert sich dieser Wert und sinkt bis zum Versuchsende leicht ab.

3.15 Mesokosmenstudie - Mikroskopische Bestimmung der bakteriellen Zellzahl

Die oben präsentierten Ergebnisse werfen eine Vielzahl von Fragen zur Aktivität der Mikroorganismen in den Mesokosmen auf. So stellt sich insbesondere die Frage, ob der Verbrauch der Nährstoffe und die Sprünge des pH-Wertes mit dem Wachstum von Bakterien korrelieren, da dieses Wachstum mit dem Verbrauch von Nährstoffen einhergehen muss. Ferner ist die Zellzahl bzw. das Wachstum von Bakterien ein gutes Mass für die biologische Aktivität in den Mesokosmen und kann Nährstofflimitationen aufzeigen.

Das Diagramm in Abb. 3.15 zeigt die Zellzahlen aus beiden Mesokosmen über den gesamten Versuchsablauf. Zu Beginn des Versuches liegt eine Zellzahl von circa $1,5 \times 10^7$ Zellen vor. In der Regel liegen in der Nordsee um Helgoland Zellzahlen zwischen 10^4 bis 10^6 Zellen pro Liter Seewasser vor, wobei die niedrigsten Werte im Winter, die höchsten bei Algenblüten im Spätsommer gemessen werden⁹³. Im Falle des Mesokosmos wurde jedoch Wasser aus einer Saugleitung entnommen, so dass diese hohe Zellzahl auf angesogenes Sediment zurückzuführen sein könnte. Da die Probe nach der Zugabe der Schwimmbarriere und des Inokulums aus mit *A. borkumensis* bewachsenem Ölbindemittel genommen wurde, könnte ebenso ein Teil des eingebrachten Zellmaterials in diese Messung mit eingegangen sein.

Abb. 3.15 zeigt für den Mikrokosmos I ein rasch eintretendes logarithmisches Wachstum; das anfängliche Wachstum lässt sich auf die optimalen Wachstumsbedingungen für ölabbauende Bakterien zurückführen. Erstaunlicherweise stagniert das Wachstum offensichtlich nach etwa acht Tagen. Dies könnte mit der Produktion von Nitrit in den Mesokosmen zusammenhängen, jedoch auch auf lokalen Sauerstoffmangel zurückzuführen sein. Ab dem Versuchstag 14 steigt die Zellzahl im Mesokosmos I wiederum, wobei ein Wachstum auch in Gegenwart von hohen Nitritkonzentrationen stattfindet. Zwischen den Versuchstagen acht und 14 bleibt die Zellzahl zunächst konstant, um zwischen den Tagen 14 und 28 in eine weitere Wachstumsphase überzugehen. Am Versuchstag 25 wurde die höchste Zellzahl des gesamten Versuches mit 2×10^8 Zellen pro Liter Mesokosmenflüssigkeit gemessen.

Nach der Aufteilung und dem Auffüllen des Mesokosmos sinkt die Zellzahl erwartungsgemäss um circa die Hälfte ab, wobei jedoch durch die Durchmischung des Beckens möglicherweise Zellen aus der Schwimmbarriere ausgeschwemmt worden sein können. Die Zellzahlen liegen in beiden Becken zunächst relativ konstant bei etwa 1×10^8 Zellen pro Liter Mesokosmenflüssigkeit. Ab dem Tag 35 sinken in beiden Becken die Zellzahlen zunächst ab, wobei diese in Mesokosmos I bis zum Tag 39 auf circa 8×10^7 fällt, danach wiederum ein exponentielles Wachstum bis zum Versuchstag 49 stattfindet, ab dem die Zellzahl konstant bleibt. Im Mesokosmos II sinkt die Zellzahl bis zum Versuchstag 45 stärker ab als im Mesokosmos I. Es werden Zellzahlen von 2×10^7 erreicht. Da jedoch nachweislich sehr hohe Nährstoffmengen und offensichtlich auch ausreichende Sauerstoffkonzentrationen vorliegen, ist das Absinken der Zellzahl relativ ungewöhnlich, zumal offenbar gute Wachstumsbedingungen vorlagen.

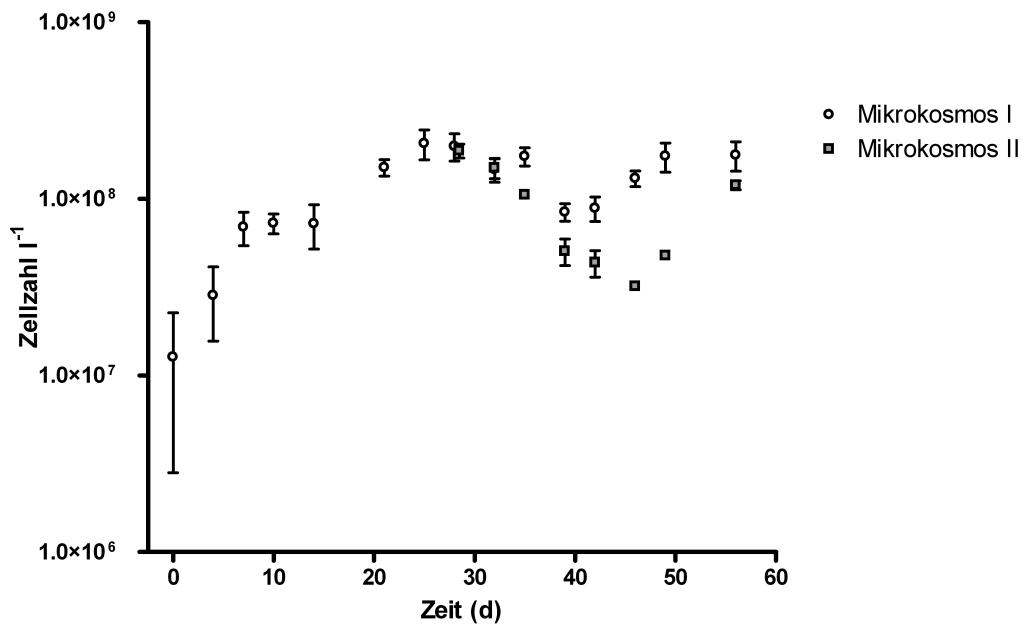


Abb. 3.15: Vergleich der Zellzahlen pro Liter Mesokosmenflüssigkeit in den Mesokosmenbecken I und II über den gesamten Versuchsablauf. Werte aus dem Mesokosmenbecken I sind mit hellen Kreisen, jene für das Mesokosmenbecken II mit grauen Quadraten dargestellt. Da der Mesokosmos II erst am Versuchstag 28 etabliert wurde, beginnt der Erfassung der Zellzahlen für dieses Becken erst ab diesem Tag. Für jeden Messzeitpunkt wurden drei Proben entnommen und die Zellzahlen mittels einer Neubauerkammer gezählt. Die im Diagramm aufgetragenen Werte repräsentieren die Mittelwerte aus je drei parallelen Messungen pro Mesokosmos und Messzeitpunkt.

Eine mögliche Erklärung für diese Vorgänge ist im Substrat der mikrobiellen Gemeinschaften zu suchen; so wurden dem Mesokosmos II als Energie- und Kohlenstoffquelle lediglich 250 l der Emulsion aus Mesokosmos I zugefügt. Der Mesokosmos II enthielt damit nur eine sehr geringe Menge Öl, jedoch durch die Schwimmatten frische Nährstoffe, zudem eine hohe Zellzahl an Bakterien. Es liegt also nahe, dass die mikrobielle Gemeinschaft in sehr kurzer Zeit das verbleibende Öl umgesetzt hat und danach eine Veränderung in der Zusammensetzung der Gemeinschaft zugunsten von Bakterien, die andere Substrate, beispielsweise Biomasse oder Bestandteile des Düngers verwerteten. Gewissheit darüber kann jedoch nur eine DNA-Fingerprinting-Analyse der Gemeinschaften in diesem Zeitraum bieten.

Eine ähnliche Situation könnte im Mesokosmos I vorgelegen haben: Auch hier war möglicherweise ein Großteil der durch die Mikroorganismen verwertbaren Kohlenwasserstoffe umgesetzt und eine Umstrukturierung der mikrobiellen Gemeinschaften im Gange. Zwar stellte die Schwimmbarriere ein erhebliches Reservoir an Schweröl dar, doch wurden in ihrem Inneren schon zuvor extrem niedrige Sauerstoffkonzentrationen gemessen, so dass das verbleibende Öl in der Barriere de facto nicht für ölabbauende Mikroorganismen umsetzbar war.

Dennoch kann durch keine der oben genannten Hypothesen die plötzliche Unterbrechung des mikrobiellen Wachstums zwischen den Versuchstagen acht und 14 im Mesokosmos I erklären.

3.16 Mesokosmenstudie - Modifizierte Messung der Sauerstoffzehrung nach Winkler

Da eine direkte Messung des gelösten Sauerstoffs mittels einer Sauerstoffelektrode bereits im Falle der Mikrokosmenversuche durchgeführt wurde, jedoch keine verwertbaren Ergebnisse brachte, wurde für die Mesokosmenversuche eine alternative Messmethode angewandt. Die Sauerstoffkonzentration wurde mittels Redoxtitration bestimmt. Das Messverfahren orientierte sich an den BSB 5 – Messungen, die zur Analyse der biologischen Aktivität in Wasserproben, insbesondere von Abwässern verwendet werden.

Dabei wurden Wasserproben von jedem Messzeitpunkt luftdicht in Probengefäßen abgeschlossen, wodurch der Sauerstoff von den mikrobiellen Gemeinschaften entsprechend ihrer Aktivität verbraucht wurde. Durch Messung von an fünf aufeinander folgenden Tagen wurde eine Verbrauchskurve für jeden Messzeitpunkt erstellt.

In die Verbrauchskurven flossen die Daten aus drei parallelen Messungen ein. Der Steigungsfaktor der Kurve wurde anhand der Formel $y = a \cdot e^{(K \cdot x)} + b$ mittels des Programms Graph Pad Prism 4 bestimmt, wobei K das Maß für die Steigung der Verbrauchskurve ist.

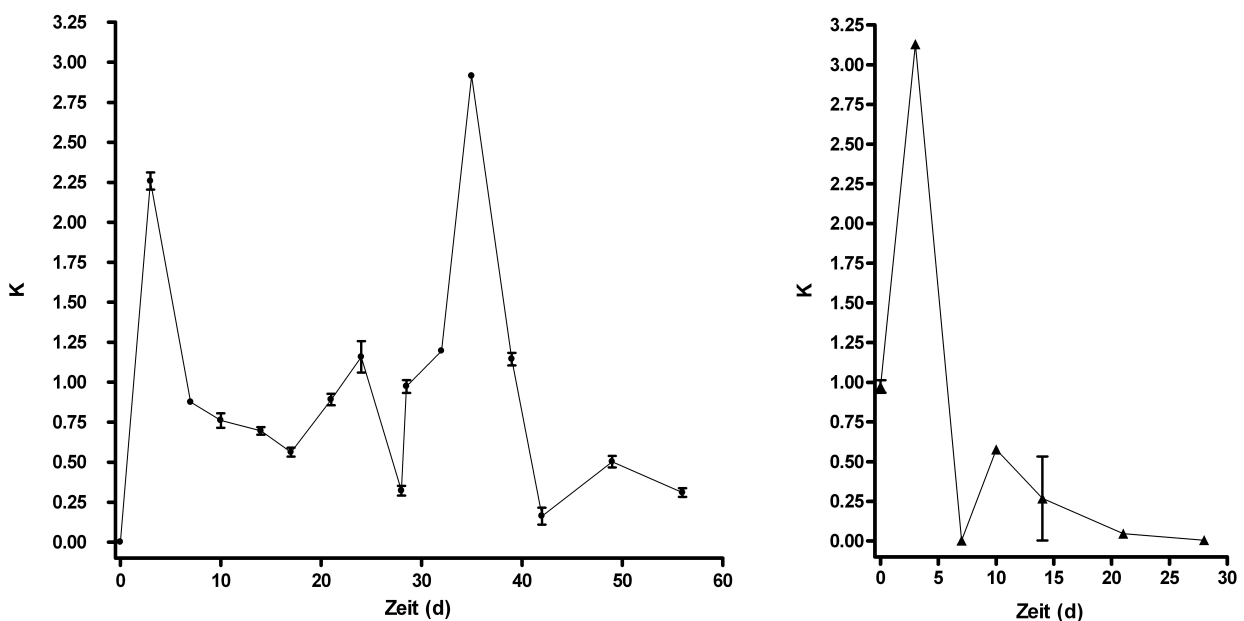


Abb. 3.16a (l.) und b (r.): Respirationsraten der mikrobiellen Gemeinschaften in Mesokosmos I (l.) und II (r.) über den gesamten Versuchsablauf. Die Herleitung des Wertes K ist weiter oben beschrieben; dieser Wert ist direkt proportional zur Intensität der Sauerstoffzehrung. Zu berücksichtigen ist die Verdünnung des Mesokosmos I am Tag 28 mittels frischen Meerwassers. Tag 0 des Mesokosmenbeckens II entspricht daher dem Versuchstag 28. Die Verbindungslinien in diesem Diagramm dienen der Übersichtlichkeit, da dicht auf der X-Achse beieinander liegende Messpunkte sehr unterschiedliche y-Werte aufweisen. Sie soll keine Tendenzen andeuten.

Bei Betrachtung der Diagramm 3.16 a und b sind zunächst drei besonders hohe Werte von K auffällig. Diese treten an den Tagen 3 und 35 im Mesokosmos I sowie an Tag 3 (Versuchstag 31) in Mesokosmos II auf. Unmittelbar nach dem Beginn des Versuches fanden die Bakterien im Mesokosmos I, wie in den Abbildungen 3.11 und 3.13 zu erkennen ist, optimale

Wachstumsbedingungen vor. Dies führte zu einer exponentiellen Wachstumsphase innerhalb der ersten 7 Tage, die Abb. 3.15 deutlich zeigt. Ab dem Versuchstag acht stagnierte jedoch das Wachstum in Mesokosmos I und die Zellzahl blieb zunächst konstant. Analog hierzu ist in Abb. 3.16 eine relativ niedrige Respirationsrate zu erkennen. Der am Tag acht gemessene Wert für K liegt um etwa 70% niedriger als der fünf Tage zuvor bestimmte; ferner sinken die K-Werte bis zum Tag 21 weiterhin ab. Zwischen dem Tag 21 und 28 kommt es zu einer leichten Steigerung der Respiration. Auch in diesem Fall korreliert diese Entwicklung mit einem Wachstum im Mesokosmos I. Nach der Aufteilung und Verdünnung des Meskosmos I sinkt die Respiration dramatisch ab, was auf die plötzliche Reduktion von Nährstoff-, Öl- und Zellkonzentration um etwa 50% im Becken I zurückzuführen ist. Die Respiration steigt nach dieser Verdünnung sprunghaft an; dies ist besonders deutlich im Mesokosmenbecken I, aus dem Proben mit sechs Stunden Differenz vor und nach der Verdünnung entnommen wurden.

Der Wert für K ist bereits wenige Stunden nach der Verdünnung um 400% höher als davor und erreicht im Becken I nach sieben, im Becken II schon nach drei Tagen einen Wert von drei oder mehr. Dieser Wert lag damit etwa 25% höher, als am Versuchstag 3, was möglicherweise an der bereits vorhandenen hohen Zellzahl von circa 10^8 Zellen pro ml lag.

Die Mesokosmen I und II zeigten in der Folge parallele Entwicklungen in Bezug auf die Respiration, wobei es jedoch eine Verschiebung von drei Tagen zwischen Becken I und II gab. Nach der einleitenden starken Respiration fielen die K-Werte in beiden Becken auf einen extrem niedrigen Wert am Tag 42 im Falle von Mesokosmos I bzw. am Tag 35 im Falle von Mesokosmos II ab. In beiden Fällen wurde nach weiteren sieben Tagen noch eine Steigerung und anschließende Stabilisierung oder Abnahme der Respiration beobachtet.

Wie bereits für den Versuchstag acht festgestellt, korreliert auch an den Versuchstagen 35 bis 42 trotz ausreichender Nähr- und Sauerstoffversorgung eine Verringerung der Respiration mit einer Reduzierung der Zellzahl. Somit scheint in den Mesokosmenbecken ein zuvor noch nicht betrachteter und in den Mikrokosmen nicht beobachteter Kontrollmechanismus ein übermäßiges Wachstum von Bakterien zu verhindern.

3.17 Mesokosmenstudie - Gaschromatographische Analyse von Ölrückständen

Ein wesentliches Kriterium für den mikrobiellen Abbau von Öl im Meer ist neben der Steigerung von Zellzahl und verstärkter Respiration der Rückgang von Öl oder bestimmter Bestandteile des Öls. Proben der Emulsion als auch des ölkontaminierten Ölbindemittels X-Oil wurden durch ein externes auf gaschromatographische Analysen spezialisiertes Labor extrahiert nach den Vorgaben von Dutta et al.⁶¹ analysiert.

Das Diagramm 3.17 zeigt die Konzentrationen langkettiger Alkane, verzweigter Kohlenwasserstoffe sowie der n-Alkylaromaten an den Versuchstagen 17 bzw. 56 im Vergleich zum unveränderten Bunker C – Schweröl. Aufgrund nicht geklärter Umstände wurden nur sehr wenige verwertbare Daten aus den Proben des Ölbindemittels erhalten. Ferner konnte für keine der aus der Emulsion extrahierten Proben ein repräsentatives Chromatogramm ermittelt werden. Die oben präsentierten Diagramme zeigen vergleichbar hohe Gesamtionenkonzentrationen auf, wodurch ein Vergleich der Chromatogramme möglich ist.

Wie aus der Abb. 3.17 hervorgeht, ist zwischen den Rückständen am Tag 17 und der Ausgangsprobe nahezu kein Unterschied zu erkennen. Am Versuchstag 56 jedoch ist eine starke Veränderung sichtbar: Nahezu alle sichtbaren Komponenten zeigen einen Rückgang ihrer Konzentration an. Insbesondere Stoffe mit niedrigen Retentionszeiten sind nahezu gänzlich verschwunden. In allen Diagrammen ist kein Peak des internen Standards Squalen, der nur sehr schwer biologisch abgebaut werden kann und daher einen Vergleich der Diagramme ermöglicht, zu erkennen. Dies ist durch einen Fehler der Firma LUA zu erklären: Da es sich bei Squalen um ein Alken, handelt, enthält das Massenspektrum kein Molekül mit einer Masse von 85 g/mol sondern lediglich ein Hexadien-Fragment mit einer Masse von 81 g/mol, in dem zwei Doppelbindungen vorhanden sind. Durch die Subtraktion nach Dutta et al. wurde dieses Molekül nicht im Chromatogramm gezeigt.

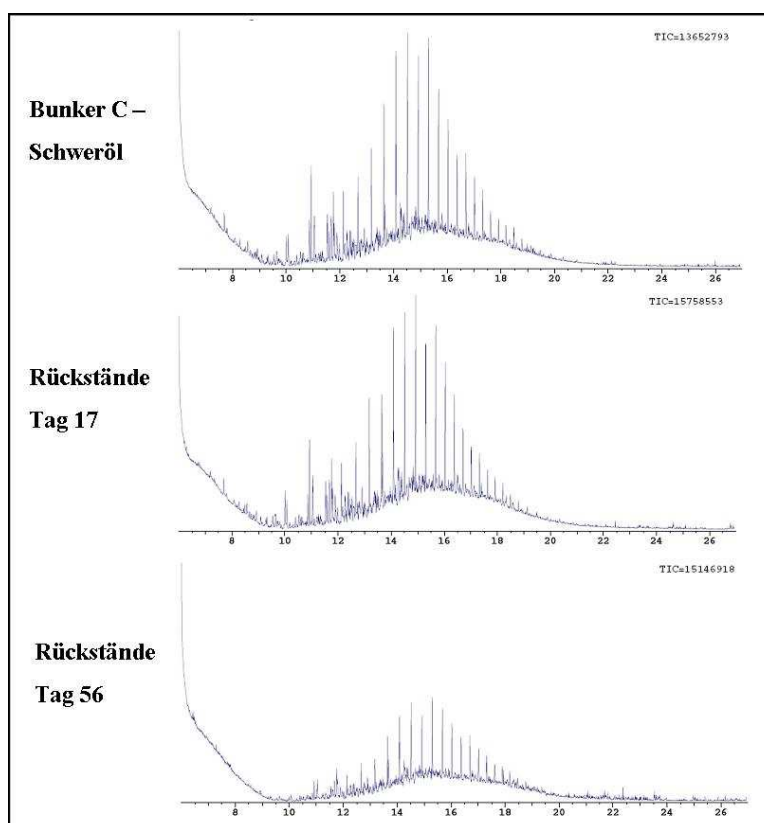


Abb. 3.17: Chromatogramm der GC-MS-Analyse von Ölrückständen, welche von der Oberfläche des Ölbindemittels X-Oil in der Schwimmbarriere des Mesokosmos I extrahiert wurden; die vorliegende Darstellung zeigt ein nach Denaro et al. gefiltertes Chromatogramm, bei dem die relativen Konzentrationen der einzelnen Substanzen (Y-Achse) gegen ihre Retentionszeit (X-Achse) aufgetragen ist. Hierzu wurden die Chromatogramme aller n-Alkane vom Gesamtionenstrom – dem Chromatogramm der Gesamtheit aller analysierten Substanzen – subtrahiert. Angezeigt werden nur Substanzen, deren Massenspektrum ein Molekül der Masse 85, einen n-Hexylrest, aufweist. Somit werden nur n-Alkane, verzweigte Kohlenwasserstoffe oder n-Alkylaromaten angezeigt. Der Gesamtionenanzahl (TIC), die relative Gesamtmenge der Stoffe in der jeweiligen Probe ist für jedes in der oberen rechten Ecke angegeben.

Der Ölabbau scheint vor allem in den ersten beiden Wochen trotz des massiven Wachstums und der starken Respiration zu Beginn des Versuches extrem schwach ausgeprägt zu sein, während zum Ende des Versuches hin ein mikrobieller Abbau des gebundenen Öls stattfindet. Ein Grund für diesen langsamen Abbau könnten zum einen die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen in der

Schwimmbarriere und somit an der Oberfläche des X-Oils sein. Zum anderen korreliert der kaum nachweisbare Abbau in den ersten beiden Versuchswochen auch mit einer rapide absinkenden Respiration und allgemein niedrigen Respirationsraten sowie einer stagnierenden Zellzahl im Mesokosmos. Es liegt also nahe, dass eine Behinderung des Ölabbau in diesen ersten beiden Versuchswochen vorliegt, die zum Ende des Versuches hin nachlässt.

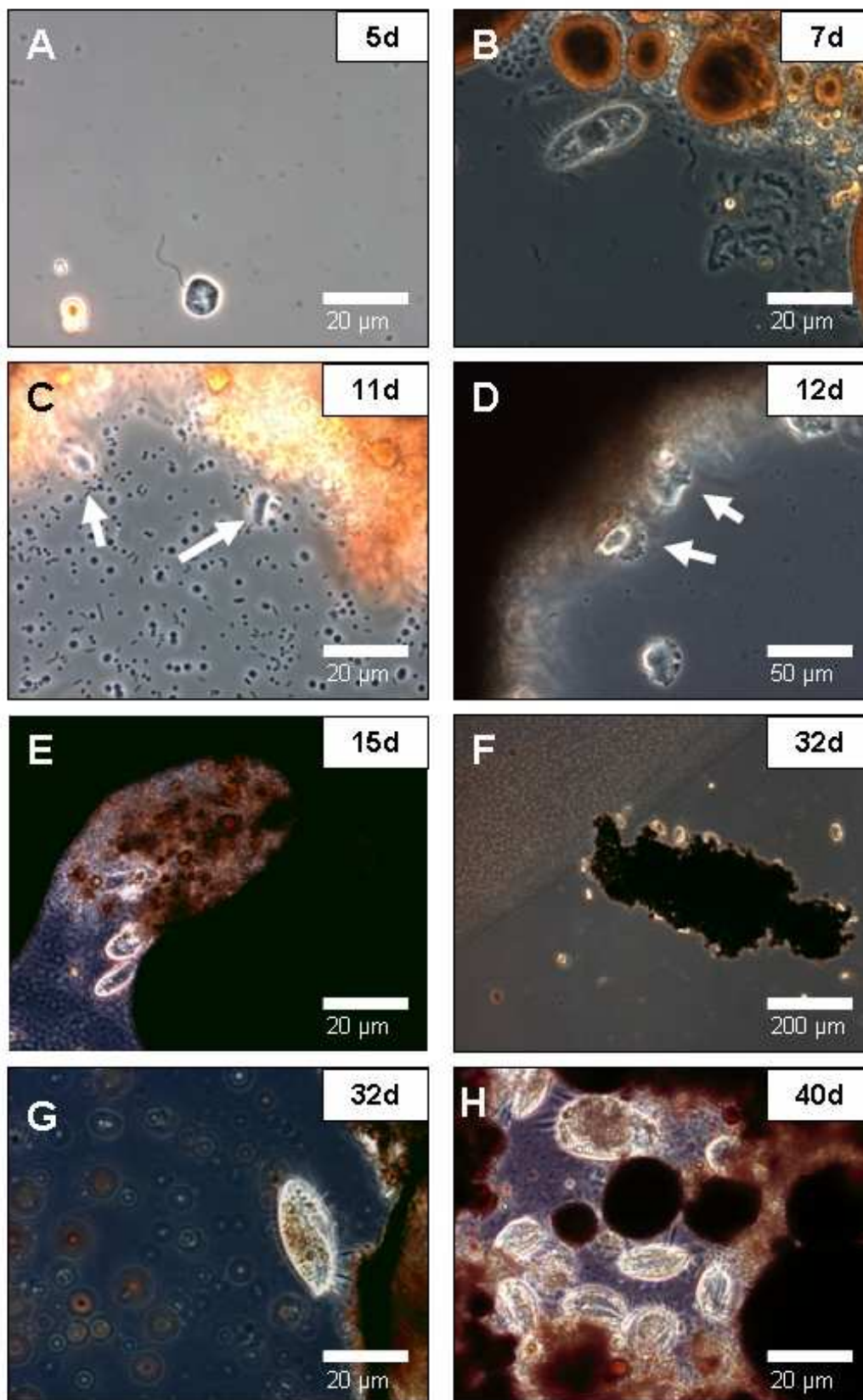
3.18 Mesokosmenstudie - Licht- und Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung von Biofilmen ölabbauender Mikroorganismen

Nach der Untersuchung der Konzentrationen verschiedener Nährstoffe, der Respiration und der Zellzahlen zeigten sich in beiden Mesokosmenbecken besondere Veränderungen aller drei Parameter innerhalb derselben Zeiträume, nämlich zwischen Tag acht und 15 sowie zwischen Tag 32 und 45. In beiden Phasen treten eine Abnahme der Respiration und der Zellzahl in einer Situation auf, in der alle wesentlichen Nährstoffe und Sauerstoff im Überfluss vorhanden sind und eine hohe Versuchstemperatur vorlag. Zur Untersuchung dieser Besonderheit wurde eine intensive mikroskopische Analyse der Mesokosmen zu den besagten Zeitpunkten unternommen. Die Abbildungen 3.18a – j zeigen einige der Beobachtungen, die in den fraglichen Zeiträumen gemacht wurden.

Erstaunlicherweise wurden schon am Versuchstag 5 eine hohe Zahl an Flagellaten im Mesokosmos I entdeckt. Abb. 3.17a zeigt einen Flagellaten mit zwei Flagellen von unterschiedlicher Größe. Diese Organismen sind in den Sommermonaten sehr häufig im Meerwasser vorhanden^{71, 97}. In der Regel handelt es sich dabei um heterotrophe Protozoen. Flagellaten von identischer oder ähnlicher Morphologie konnten ab dem Versuchstag 5 in sehr hoher Anzahl vor allem in der unmittelbaren Umgebung der von Biofilmen umschlossenen Öltropfen beobachtet werden.

Im selben Zeitraum konnten die in Abb. 3.18b gezeigten Ciliaten beobachtet werden und traten in geringfügig kleineren Zahlen als die Flagellaten auf. Diese Protozoen zeigten eine sehr hohe Motilität und Aktivität in der Mesokosmenflüssigkeit. In der Regel waren auch diese Ciliaten in der Nähe der Biofilmaggregate sichtbar, im Gegensatz zu den Flagellaten waren diese aber auch zwischen den Biofilmen in der Mesokosmenflüssigkeit erkennbar. Ciliaten wie in Abb. 3.18b und Abb. 3.18e traten auch am Versuchstag 15 auf. Insgesamt waren diese Protozoen über den gesamten Versuchsablauf sichtbar, wenn auch in verschiedener Anzahl. Exemplare dieser Morphologie waren häufig wie in Abb. 3.17e auf der Oberfläche der Biofilme zu beobachten, wobei sie mit dem vorderen Ende der Zelle mit dem Zellmund (Cytostom) in den Biofilm eintauchten.

Die Abb. 3.18b und c zeigen zwei weitere Arten von Protozoen, eine weitere Art von Flagellaten sowie eine marine Art von Amöben. Die an Versuchstag 11 beobachteten Flagellaten hatten im Vergleich zu den Exemplaren in Abb. 3.18a eine ellipsoide Form sowie zwei gleichgroße Flagellen. Flagellaten von dieser Art wurden nur wenige Tage im Mesokosmos mikroskopisch nachgewiesen. Im Gegensatz zu diesen Protozoen waren ab dem Versuchstag die in Abb. 3.18c abgebildeten Amöben in großen Anzahlen sowohl in der Phase zwischen Versuchstag acht und 15 als auch zwischen Tag 35 und 45 in beiden Mesokosmen sichtbar. Diese Organismen waren fast ausschließlich an der Oberfläche der Biofilme zu erkennen, traten dort jedoch in einer sehr hohen Dichte auf.



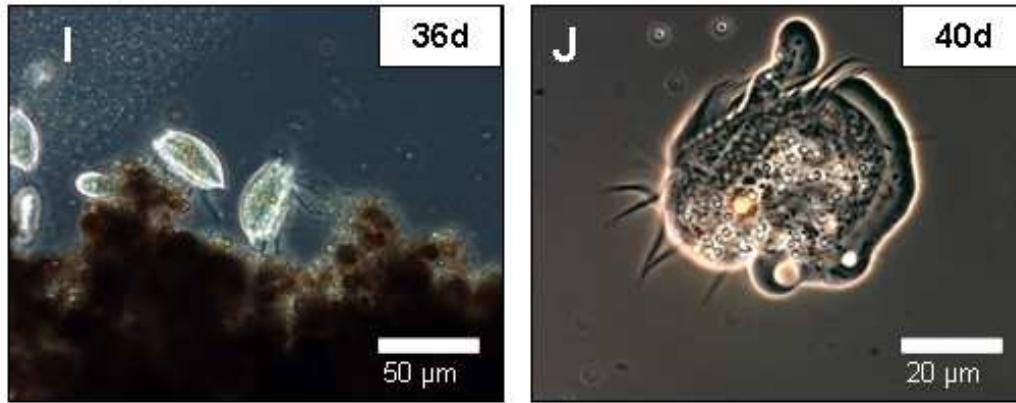


Abb. 3.18a – j: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen aus Phasen intensiven Grazings. Sämtliche Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axioskop und der Software AxioCam angefertigt. Die Präparate zu den oben präsentierten Aufnahmen entstammen gänzlich dem Mesokosmos I, wobei jedoch ähnliche Beobachtungen im Mesokosmos II gemacht werden konnten. Da verschiedene Vergrößerungen zwischen 100 und 1000fach verwendet wurden, enthalten sämtliche Abbildungen einen Referenzbalken mit Längenangabe in der unteren rechten Ecke. Der Zeitpunkt in Tagen (d) seit Versuchsbeginn wird in der oberen rechten Ecke angegeben.

In der Abb. 3.18c sind vier Amöben mit einem Durchmesser von je circa 25 µm auf einer Oberfläche von 300 µm des Biofilms zu erkennen. Amöben waren im Mesokosmenbecken I bereits kurze Zeit nach ihrer ersten Beobachtung zahlenmässig häufiger in der Nähe der Biofilme anzutreffen als die zuvor erwähnten Flagellaten und Ciliaten.

Ein möglicher Grund für diese Tendenz ist in Abbildung 3.18j zu erkennen, auch wenn diese am Versuchstag 40 entstanden ist. Das Bild zeigt einen mit einer Länge von fast 40 µm relativ großen Ciliaten, der von einer Amöbe umschlossen und mittels Phagocytose verdaut wird. Gut erkennbar sind die Cirrenbündel an der Oberseite des Ciliaten, die bereits keine Aktivität mehr aufweisen. Einschränkend muss aber festgehalten werden, dass der beobachtete Ciliat möglicherweise bereits inaktiv war und als tote Materie durch die Amöbe aufgenommen wurde. Phagocytose von Ciliaten durch Amöben wurde jedoch mehrfach während der mikroskopischen Untersuchungen dokumentiert. Ciliaten derselben Morphologie wie der in Abb. 3.18j phagocytierte wurden besonders häufig zwischen der Versuchstagen 15 und 28 sowie ab dem Versuchstag 32 im Mesokosmos I nachgewiesen. Dabei traten morphologisch ähnliche Ciliaten mit unterschiedlicher Größe auf. Diese Art von Protozoen zeigten ähnlich hohe Zellzahlen wie die Amöben zwischen Versuchstag acht und 15. Jedoch traten parallel zu diesen auch andere Flagellaten und Ciliaten auf. Abb. 3.18f zeigt ein Biofilmaggregat, auf dessen Oberfläche einige dieser sowie einige der in Abb. 3.18b und e aufgeführten Ciliaten auftreten.

Besonders bemerkenswert an den oben erwähnten Ciliaten ist ihre Fortbewegung über den Biofilm, die den Eindruck erweckt, die Protozoen würden auf den Cirren über die Biofilme „laufen“. Diese Art der Fortbewegung ist besonders gut in den Abb. 3.18i und g zu erkennen. Organismen dieser Morphologie und Motilität sind in der Literatur insbesondere in dichten Ansammlungen von Algenmaterial oder marinem „Schnee“ (marine snow) beschrieben worden⁷¹. Ähnlich wie in diesen Ansammlungen von organischem Material wurden auch in den Biofilmen lokale Ansammlungen dieser Ciliaten von enormer Dichte beobachtet.

Die Abb. 3.18h zeigt die dichteste während der Versuche beobachtete lokale Konzentration an Protozoen auf einem Biofilmaggregat am Versuchstag 40 im Mikrokosmos I. In Abb. 3.18h sind neun Protozoen auf einer Fläche von circa 2500 μm^2 erkennbar. Die Protozoen suchen also entweder aktiv die Biofilme auf oder vermehren sich in der Nähe der Aggregate.

Die oben gezeigten Abbildungen der Protozoen geben nur einige der beobachteten morphologischen Typen an. Die Morphologie von Protozoen ist hierbei ein wesentliches Kriterium der Identifikation einzelner Spezies, erfordert jedoch besondere Erfahrungen auf diesem Gebiet. Für die Einordnung zu Familien oder sogar Gattungen sind jedoch verschiedene Bestimmungsschlüssel verfügbar. Eine genaue Einordnung erfolgt weiter unten ausserdem mit den Mitteln der Molekularbiologie.

3.19 Mesokosmenstudie - Zellzählungen der Protozoen nach Sedgewick-Rafter

Analog zu den Zellzählungen der Bakterien mittels Zählkammern wie der Thoma- oder Neubauerkammer sind für die viel größeren Protozoenzellen mikroskopische Zählverfahren entwickelt worden. Beim Zählverfahren nach Utermöhl werden Protozoen gefärbt und mittels Kaliumiodid gefällt. Absinkende Protozoen werden dann anhand eines Zählgitters gezählt. Dieses Verfahren erfordert jedoch ein Inversmikroskop und spezielle Zählkammern. Ferner müssen sämtliche Proben speziell vorbehandelt werden.

Ein einfacheres Verfahren ist die Zellzählung nach Sedgewick-Rafter. Hierbei wird eine Probe in eine Sedgewick-Rafter-Kammer gefüllt. Es handelt sich dabei um einen Objektträger, der eine Vertiefung aufweist, die Volumen von 1 ml hat, wobei der Boden der Kammer in 1000 Quadraten von je 1 μm^2 aufgeteilt ist. Durch Abdecken der Kammer mit einem Deckgläschen und zehnmütiger Inkubation werden die inzwischen abgesunkenen Protozoen ausgezählt. Um ein statistisch relevantes Ergebnis zu erhalten, wurden jeweils zwischen 500 und 1500 Protozoen gezählt.

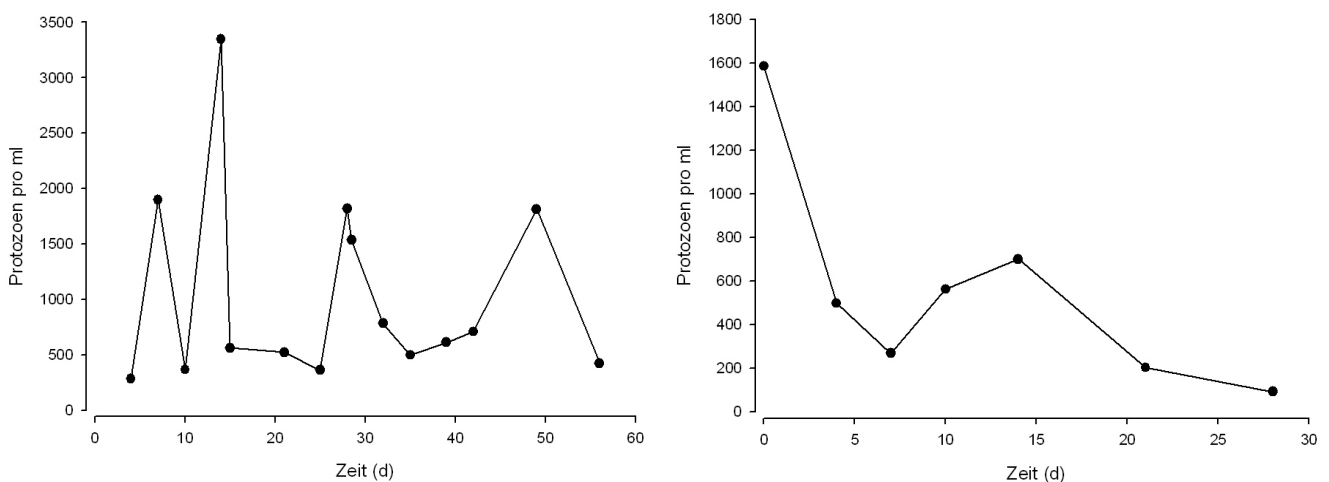


Abb. 3.19 a (r.) und b (l.) Zellzahlen der Protozoen in Mesokosmos I (l.) und Mesokosmos II (r.). Gezählt wurden > 500 Zellen pro Probe mittels des Sedgewick-Rafter-Verfahrens. Zu berücksichtigen ist die Erstellung des Mesokosmos II am Versuchstag 28. Somit entspricht der Tag null dem Tag 28 im Mesokosmos I.

Die Abbildungen 3.19 a und b zeigen die Konzentrationen der Protozoen in den Becken I und II. Da die Protozoen erst im Laufe des Versuches entdeckt wurden, konnte nur auf Probenmaterial, welches zuvor mittels Paraformaldehyd fixiert wurde, zurückgegriffen werden. Es lag daher nur eine Probe pro Messzeitpunkt vor. Um einen statistisch aussagekräftigen Wert angeben zu können wurden wie bereits erwähnt mindestens 500 Protozoen pro Messzeitpunkt gezählt. Die Zählung beinhaltet dabei gleichermassen Flagellaten, Ciliaten und insofern erkennbar Amöben. Amöben konnten jedoch nur schwer erkannt werden, da die fixierten Zellen eine Kugelform annehmen und schwer zu identifizieren sind.

Wie die Abb. 3.19a zeigt, schwanken die Konzentrationen der Protozoen im Mesokosmos I über den Versuchsverlauf sehr stark: Insbesondere an den Tagen acht und zwölf kam es zu Blüten mit enorm hohen Zellzahlen, wobei bis zu 3500 Ciliaten und Flagellaten pro ml Mesokosmenflüssigkeit beobachtet wurden. Am Tag zehn wurde im Vergleich eine sehr viel geringere Zellzahl gemessen, was durch einen Generationswechsel oder eine Veränderung der Protozoengemeinschaft bedingt sein könnte. In der Tat sind solche Veränderungen nicht ungewöhnlich für Protozoen, deren Wachstum sich völlig anders verhält als jenes von Prokaryoten. So stirbt unter Umständen ein großer Teil einer Population ab, während parallel dazu eine Nachfolgegeneration anwächst. Protozoen zeigen daher ein Wachstum in Form von aufeinander folgenden Wellen.

Ab dem Tag 14 bleibt die Zellzahl im Mesokosmos I zunächst konstant bei circa 500 Zellen pro ml, steigt darauf an auf 2000 Zellen pro ml, bis der Mesokosmos verdünnt wird. Nach der Verdünnung sinkt die Konzentration wiederum ab auf 500 Zellen pro ml, wobei am Tag 49 erneut ein kurzfristiges Wachstum eintritt. Im Mesokosmos II tritt eine ähnliche Entwicklung ein; die Zellzahl sinkt innerhalb der ersten acht Tage ab auf einen Wert von etwa 200 Zellen pro ml, steigt darauf bis zum Tag 14 an auf einen Wert von 600 Zellen pro ml und sinkt danach bis zum Versuchsende kontinuierlich ab.

Zur Interpretation dieser Werte muss berücksichtigt werden, dass das Wachstum der Protozoen von mehreren Faktoren abhängt; so ist zunächst die Menge an Beute entscheidend, andererseits treten offenbar auch innerhalb der Protozoengemeinschaft Verschiebungen auf. So ist es durchaus möglich, dass Flagellaten die Beute von Ciliaten und diese wiederum die Beute von Amöben werden. Eine genaue Bestätigung dieser Vermutung ist jedoch mit mikroskopischen Methoden nicht möglich, da eine Zählung von Flagellaten wegen ihrer Größe und eine Zählung der Amöben wegen ihrer Form extrem schwierig ist. Hierfür sind molekularbiologische Methoden nötig, die weiter unten beschrieben werden.

Dennoch sind bei einem Vergleich der bakteriellen Zellzahlen in Abb. 3.13 und Respiration in Abb. 3.14 sowie der Zellzahlen der Protozoen deutliche Parallelen zu erkennen; so tritt beispielsweise im Mesokosmos I zwischen den Tagen acht und 14 sowie am Tag 25 eine hohe Konzentration an Protozoen auf. Im selben Zeitraum kommt es in diesem Mesokosmos zu einem Rückgang des bakteriellen Wachstums bzw. einer Stabilisierung der bakteriellen Zellzahl sowie einem Rückgang der Respiration.

Nach dem Tag 28 treten Phasen von Protozoenwachstum zwischen den Tagen 42 und 50 im Mesokosmos I und zwischen den Versuchstagen 35 und 43 im Mesokosmenbecken II auf. Auch in diesen Zeiträumen wurden jeweils äusserst geringe Werte für die Respiration ermittelt. Jedoch ist eine Erhöhung der bakteriellen Zellzahl im Mesokosmos I im besagten Zeitraum, im Mesokosmos II hingegen eine weiterführende Reduktion der bakteriellen Zellzahl zu erkennen. Für den Mesokosmos deutet dies auf eine Verknappung der Nährstoffmenge hin, wodurch die bakterielle Zellzahl absinkt und dadurch auch kein Wachstum von Protozoen mehr möglich ist.

3.20 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in Mesokosmos I mittels DGGE

Analog zu der Mikrokosmenstudie sollte auch im Falle der Mesokosmen die qualitative Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in der Mesokosmenflüssigkeit und von der Oberfläche des X-Oils durchgeführt werden. Eine Untersuchung der im Mesokosmos und auf dem X-Oil vorhandenen RNA sollte ferner die aktive Fraktion der Mikroorganismengemeinschaft aufzeigen.

Im Folgenden werden die einzelnen DGGE-Gele der DNA-Proben aus der Mesokosmenflüssigkeit (Gel/Banden „M“), der RNA-Proben aus der Mesokosmenflüssigkeit (Gel/Banden „R“) sowie der DNA-Proben von der X-Oil-Oberfläche (Gel/Banden „X“) präsentiert. Als Marker der einzelnen Gele wurden vier PCR-Produkte der Banden 70, 73, 80 und 81 aus den Mikrokosmenversuchen verwendet. Hierbei ist besonders Bande 70 von Bedeutung, da diese im Falle des Auftretens von Banden gleicher Lauflänge in den Gelen einen Hinweis auf die Anwesenheit von *Alcanivorax borkumensis* geben kann.

Mikrobielle Gemeinschaften in der Wassersäule

Die Abbildung 3.20 a zeigt die Fingerprinting-Muster der in der Mesokosmenflüssigkeit anhand der vorliegenden DNA nachweisbaren mikrobiellen Gemeinschaften. Für den Versuchstag 0 wurde kein PCR-Produkt erhalten, das PCR-Produkt für den Versuchstag 3 war hingegen zu schwach um ein erkennbares Muster zu zeigen. Aus bislang ungeklärter Ursache – möglicherweise durch eine chemische Kontamination - wurde nur ein geringer Teil der aus dem Gel extrahierten Banden erfolgreich reamplifiziert und sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tab. 3.IIa aufgeführt, eine phylogenetische Analyse in Abb. 3.20 d.

Es sind deutliche Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaften über den gesamten Versuchsablauf zu erkennen, wobei es zwischen den Versuchstagen sieben bis 18 und den Versuchstagen 28 bis 35 Phasen gibt, in denen die Gemeinschaften eine sehr ähnliche Zusammensetzung haben. Ab dem Versuchstag 42 sind nur noch geringfügige Änderungen zu erkennen. An den Versuchstagen 21 und 24 ist scheinbar ein Übergang von einer mikrobiellen Gemeinschaft in die andere sichtbar.

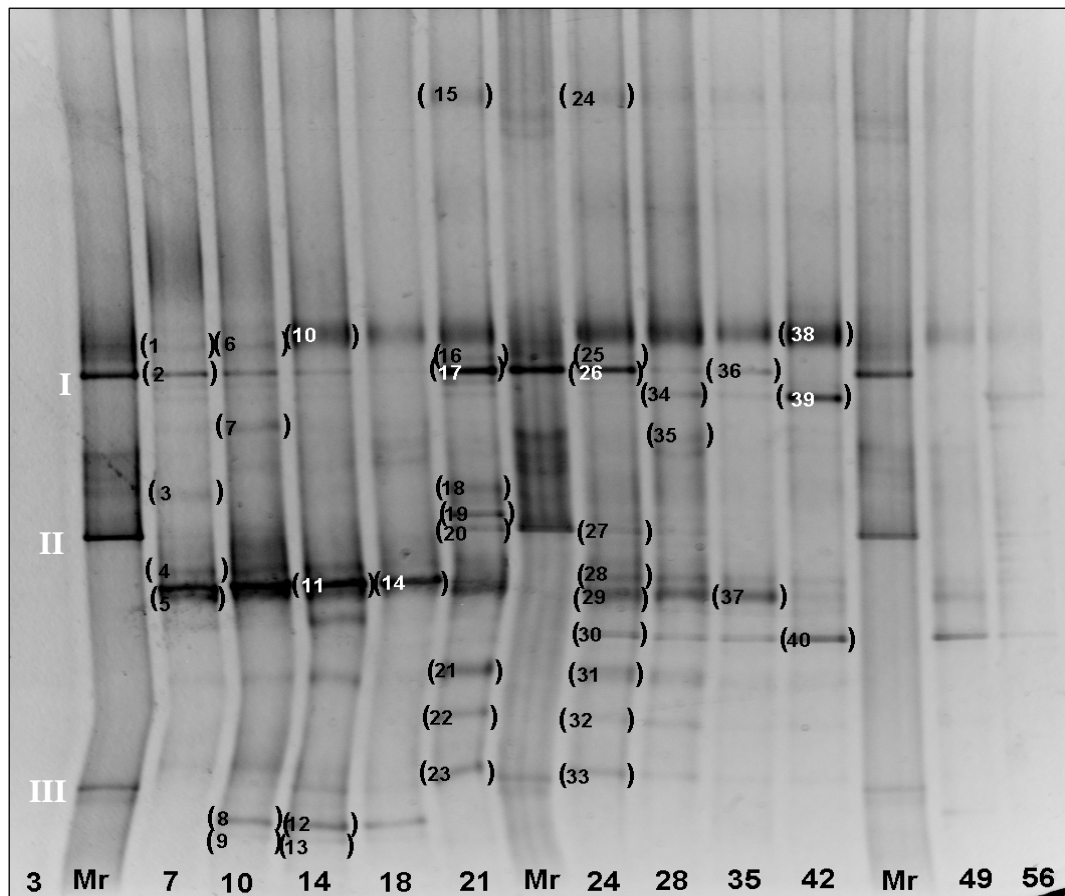


Abb. 3.20 a: Denaturierendes Gradientengel der DNA-Proben aus der Mesokosmenflüssigkeit des Mesokosmos I. Aufgetragen sind Proben der Versuchstage 3 bis 56. Für den Zeitpunkt 0 konnte kein PCR-Produkt erhalten werden. Der Versuchstag der jeweiligen Probe ist am unteren Ende des Gels aufgetragen. Die Beschriftung „Mr“ steht für den oben beschriebenen Marker. Die im Marker enthaltenen Banden 70 (I), 73 (II) und 80 (III) sind gesondert in weißen Zahlen aufgeführt. Die Markerbande 81 hat das Gel vollständig passiert und wurde nicht abgebildet. Die in runden Klammern markierten Banden wurden extrahiert und sequenziert. Diese Banden werden weiter unten unter den entsprechenden Nummern aufgeführt. Der Gradient des Gels reichte von 15 – 55% Formamid/Harnstoff.

Von besonderer Intensität in den ersten zwei Versuchswochen ist die Bande 14 (11). Erstaunlicherweise lässt die Intensität dieser Bande mit dem Fortschreiten des Versuches nach. Dies könnte auf einen Zusammenhang mit dem Substrat Schweröl hindeuten, dessen Konzentration ebenso zum Ende des Versuches hin abnimmt. Die aus dieser Bande isolierte DNA-Sequenz hat eine hohe Ähnlichkeit mit *Sulfatobacter litoralis*. Eine ähnliche Beobachtung ist für die Bande D2 (17, 26, 36) zu machen: Diese Bande ist am Versuchstag 7 relativ intensiv, lässt darauf nach, um an den Versuchstagen 21 und 24 zu hoher Intensität zu gelangen und darauf wieder nachzulassen. Analog zur Markerbande I konnte eine hohe Ähnlichkeit der 16S-rDNA zu *Salegentibacter sp.* nachgewiesen werden.

Über den gesamten Versuchsablauf erlangt die relativ unscharfe Bande D10 (38) eine hohe Intensität, die vom Versuchstag 10 bis zum Versuchsende sichtbar ist. Auch hier könnte ein Zusammenhang zur Präsenz des Schweröls möglich sein.

Ab dem Versuchstag 21 tritt eine Veränderung der Gemeinschaften ein, in deren Folge die Banden D34 (39), D29 (37) und D30 (40) an Intensität zunehmen. Die letzteren beiden der genannten Banden konnten *Roseobacter sp.* zugeordnet werden. Diese Mitglieder der Alphaproteobakterien gehören in der Regel zur autochthonen Mikroflora des Meeres, werden jedoch insbesondere bei Mikrokosmenstudien sehr häufig nachgewiesen⁹⁵. Diese Banden sind oft bis zum Ende des Versuches sichtbar. Jedoch besteht bei diesen Banden die Möglichkeit, dass sie Organismen anzeigen, die entweder von der vorhandenen Biomasse, von Sekundärmetaboliten oder aber von schwer abbaubaren Bestandteilen des Öls profitieren. Die bislang nicht aufgeführten Banden treten in Phasen des Übergangs von einer mikrobiellen Gemeinschaft in eine andere auf. Der Grund hierfür könnte beispielsweise der Verbrauch einer Ressource, zum Beispiel eines bestimmten Bestandteils des Öls sein. Diese Organismen könnten kurzfristig von der Entfernung oder dem Absterben bestimmter Teile der Gemeinschaft profitieren, durch die ökologische Nischen frei werden. Mit dem Auftreten von Organismen, die besser an die sich bietende Situation angepasst sind, würden solche Mikroorganismen nach und nach verschwinden, was vor allem für die Banden D18 bis D23 beobachtet werden konnte.

Die erstaunlichste Entdeckung in dem oben präsentierten Gel ist die fast vollständige Abwesenheit einer Bande von *A. borkumensis*. Während dieser Organismus in den oben beschriebenen Mikrokosmen in den DGGE-Gelen mit enormer Intensität nachweisbar war, konnten hier nur an den Versuchstagen 21 und 24 eine relativ schwache Bande, die dieselbe Position im Gel aufweist wie die Markerbande 73 (II), entdeckt werden. Die Sequenzierung der DNA aus der relativ unscheinbaren Bande D28 zeigte überraschenderweise eine hohe Ähnlichkeit zu *Lutibacterium anuloederans*. Dieses Bakterium besitzt die Fähigkeit, aromatische Kohlenwasserstoffe zu verwerten.

Tab. 3.IIa: Vergleich der DNA-Sequenzen der aus dem Gel in Abb. 3.20a extrahierten Banden mit DNA-Sequenzen aus der Datenbank GenBank mittels BlastN. Angegeben sind die Nummer der in Abb. 3.20a aufgeführten Sequenzen der DNA aus den Banden sowie die ermittelte DNA-Sequenz (GenBank Accession Nr.) mit der höchsten prozentualen Ähnlichkeit. Zusätzlich angegeben sind die zu jeder Sequenz ermittelte Art sowie deren phylogenetische Zuordnung. Alle ausgeschnittenen Banden wurden mit beiden Primern sequenziert und ein Sequence assembly mittels der CAP-Subroutine des Programms Bioedit durchgeführt.

Bande Nr.	Spezies (größte Ähnlichkeit) Accession Nr. (GenBank)	Phylogenetische Gruppe	%
D2	<i>Salegentibacter</i> sp. AY576653	<i>Bacteroidetes</i> ; <i>Flavobacteria</i> ; <i>Flavobacteriales</i> ; <i>Flavobacteriaceae</i>	99
D14	<i>Sulfitobacter litoralis</i> X78312	<i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Rhodobacteraceae</i>	91
D17	<i>Salegentibacter</i> sp. AY576653	<i>Bacteroidetes</i> ; <i>Flavobacteria</i> ; <i>Flavobacteriales</i> ; <i>Flavobacteriaceae</i>	93
D28	<i>Lutibacterium anuloederans</i> AY026916	<i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Sphingomonadales</i> ; <i>Sphingomonadaceae</i>	91
D29	<i>Roseobacter</i> sp. AF513439	<i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Rhodobacteraceae</i>	92
D37	<i>Saprospira grandis</i> AB088636	<i>Bacteroidetes</i> ; <i>Sphingobacteria</i> ; <i>Sphingobacteriales</i> ; <i>Saprospiraceae</i>	80
D38	<i>Yeosuana aromativorans</i> AY682382	<i>Bacteroidetes</i> ; <i>Flavobacteria</i> ; <i>Flavobacteriales</i> ; <i>Flavobacteriaceae</i>	91
D40	<i>Roseobacter</i> sp. DG869 AY258074	<i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Rhodobacteraceae</i>	93

Mikroorganismengemeinschaften auf der Oberfläche des Ölbindemittels

Im Gegensatz zur Abb. 3.20a zeigt das Gel der DNA-Proben von der Oberfläche des X-Oils relativ gleichmässige Muster. An den Versuchstagen 0 und 3 ist jeweils nur eine schwache Bande zu erkennen. Diese befindet sich in derselben Position im Gel wie die für *A. borkumensis* charakteristische Markerbande II (73). Im Gegensatz zu den Fingerprintinganalysen der Gemeinschaften in der Mesokosmenflüssigkeit kann diese über den gesamten Versuchsablauf nachgewiesen werden. *A. borkumensis* siedelt also hauptsächlich auf dem Schweröl, welches an das Ölbindemittel gebunden wurde. Die Spur RNA 14 zeigt darüber hinaus, dass dieser Organismus metabolisch aktiv war. Neben *A. borkumensis* kann noch eine Anzahl weiterer Banden in den Gelen über die gesamte Versuchszeit beobachtet werden, beispielsweise die Banden X7 (15, 22), X13 (19, 33) sowie X20 (26). Wie bereits im Falle der extrahierten Banden des Gels in Abb. 3.19 a konnten hier nur einige wenige Banden eindeutig identifiziert werden; so konnte die Bande X2 *A. borkumensis* zugeordnet werden. Ebenso wie in den Profilen der Proben aus der Mesokosmenflüssigkeit konnte *T. lucentensis* anhand der Bande X33 nachgewiesen werden. In einer Studie wurde *T. lucentensis* in Biofilmen, die auf mit Seewasser gespülten Ölpipelines wachsen, beobachtet⁹⁰. Die DNA-Sequenzen in der Bande X20 besitzt eine hohe Ähnlichkeit zu *Owenweeksia hongkongensis*, während die Bande X 7 anhand ihrer Position auf *Salegentibacter* sp. zurückzuführen ist. Beide Vertreter der Flavobakterien wurden bereits im Rahmen der Mikrokosmenstudie nachgewiesen, jedoch besitzen diese keine Fähigkeiten zum Abbau von Kohlenwasserstoffen⁹⁸ und wurden im Gegensatz zu *T. lucentensis* auch nicht in Verbindung mit Ölverschmutzungen im Salzwasser nachgewiesen.

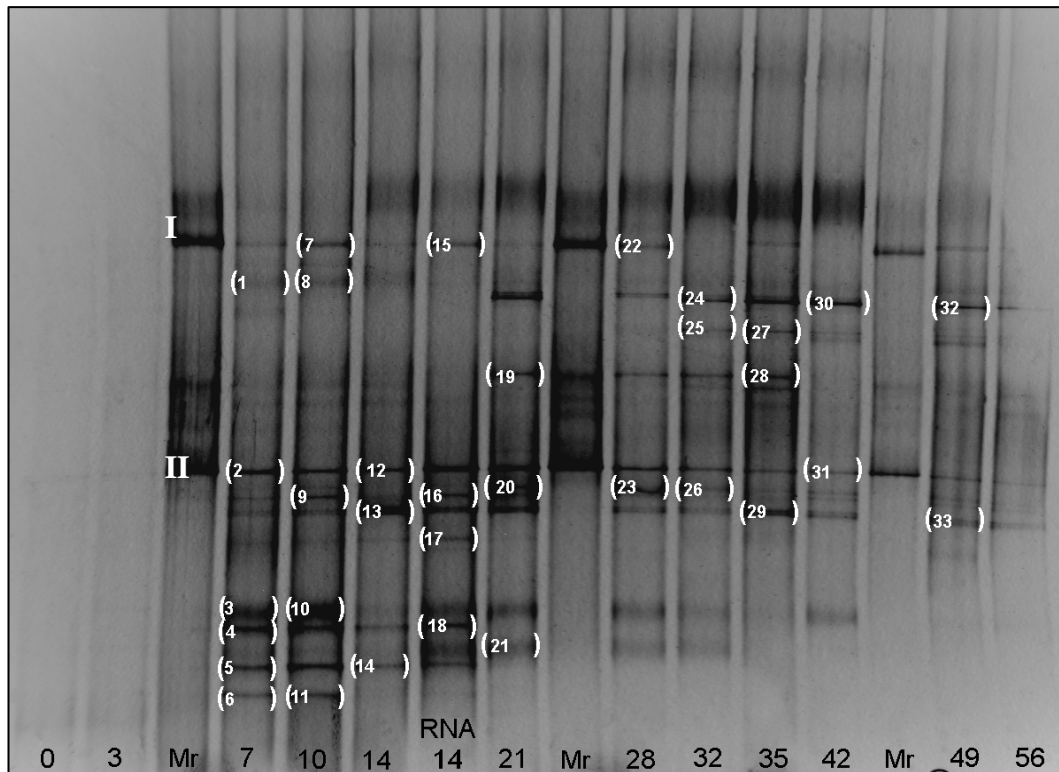


Abb. 3.20 b: Denaturierendes Gradientengel der DNA-Proben von der Oberfläche des X-Oil-Bindemittels aus der Schwimmbarriere des Mesokosmos I. Aufgetragen sind Proben der Versuchstage 0 bis 56. Der Versuchstag der jeweiligen Probe ist am unteren Ende des Gels aufgetragen. Die Beschriftung Mr steht für den oben beschriebenen Marker. Die im Marker enthaltenen Banden 70 (I) und 73 (II) sind gesondert in weißen Zahlen aufgeführt. Die Markerbanden 80 und 81 hat das Gel vollständig passiert und wurde nicht abgebildet. Die in runden Klammern markierten Banden wurden extrahiert und sequenziert. Diese Banden werden weiter unten unter den entsprechenden Nummern aufgeführt. Die mit der Markierung „RNA 14“ bezeichnete Probe enthält cDNA, die durch reverse Transkription der RNA-Probe des Versuchstags 14 entnommen wurde; dies war die einzige Probe, bei der eine PCR-Amplifikation gelang. Der Gradient des Gels reichte von 15 – 55% Formamid/Harnstoff.

Ein anderer Teil der Banden tritt lediglich zu Beginn des Versuches auf, scheint aber im Laufe des Versuches an Bedeutung zu verlieren. Dabei handelt es sich um die Banden X1 sowie X3 bis 6. Hierbei könnte es sich um schnell wachsende Bakterien handeln, die von dem schnell verfügbaren Angebot an Stickstoff- und Phosphatverbindungen profitieren. Im Laufe des Versuches könnten sie durch den besser angepassten *A. borkumensis* verdrängt worden sein. Parallel zum Verschwinden der oben genannten Banden treten die Banden X24 (30, 32) sowie X19 (28) erst ab dem Versuchstag 21 auf, wobei die 24 bis zum Versuchsende sichtbar bleibt, während Bande X19 nach dem Tag 35 nicht mehr erkannt werden konnte.

Trotz der in Abb. 3.11 erkennbaren niedrigen Konzentration gelösten Sauerstoffs von lediglich circa 5 mg/l am Versuchstag 21 und einem anaeroben Milieu in der Schwimmbarriere ab Tag 30 wurden keine strikt anaeroben Bakterien auf der Oberfläche des X-Oils nachgewiesen. Der Grund hierfür kann die hohe Konzentration an Nitrat im Mesokosmenbecken I sein.

Dies bevorteilt in erheblichem Masse denitrifizierende Bakterien, da diese unter Verwendung von Nitrat als alternativem Elektronenendakzeptor Substrate mit einer höheren Energieeffizienz als anaerobe Bakterien oder Gärer verwerten können.

Eine weitere bemerkenswerte Entdeckung ist der Nachweis einer DNA-Sequenz mit hoher Ähnlichkeit zu *Thalassolituus oleivorans* in Bande X 4. Dieser Organismus gehört zusammen mit *A. borkumensis* zu den marinen hydrocarbonoclastischen Bakterien und tritt in warmen Meeren auf, wo es mit *A. borkumensis* konkurriert oder koexistiert ^{26, 50}. In den Profilen der X-Oil-Proben ist *T. oleivorans* nur innerhalb der ersten 14 Versuchstage nachzuweisen, danach ist die Bande bis zum Versuchsende nicht mehr sichtbar. Jedoch ist im Profil der RNA-Probe vom Versuchstag 14 deutlich eine diesem Organismus zugeordnete Bande in hoher Intensität zu erkennen.

Tab. 3.IIb: Vergleich der DNA-Sequenzen der aus dem Gel in Abb. 3.20b extrahierten Banden mit DNA-Sequenzen aus der Datenbank GenBank mittels BlastN. Angegeben sind die Nummer der in Abb. 3.20b aufgeführten Sequenzen der DNA aus den Banden sowie die ermittelte DNA-Sequenz (GenBank Accession Nr.) mit der höchsten prozentualen Ähnlichkeit. Zusätzlich angegeben sind die zu jeder Sequenz ermittelte Art sowie deren phylogenetische Zuordnung. Alle ausgeschnittenen Banden wurden mit dem forward- und dem reverse primer sequenziert und ein sequence assembly (Überlagerung und Korrektur der beiden Sequenzen) mittels der CAP-Subroutine des Programms Bioedit durchgeführt.

Bande Nr.	Spezies (größte Ähnlichkeit) Accession Nr. (GenBank)	Phylogenetische Gruppe	%
X2	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 AM286690	<i>Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Alcanivoracaceae</i>	90
X3	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i> DQ342323	<i>Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	90
X4	<i>Thalassolituus oleivorans</i> AM279755	<i>Gammaproteobacteria; Oceanospirillales</i>	87
X5	<i>Terasakiella pusilla</i> AB006768	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methylocystaceae</i>	88
X10	<i>Maritimibacter alkaliphilus</i> DQ915443	<i>Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	86
X12	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 AM286690	<i>Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Alcanivoracaceae</i>	97
X16	<i>Paracoccus versutus</i> AF437875	<i>Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	87
X17	<i>Reinekia blandensis</i> DQ403810	<i>Gammaproteobacteria</i>	76
X20	<i>Owenweeksia hongkongensis</i> AB125062	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Cryomorphaceae</i>	84
X32	<i>Owenweeksia hongkongensis</i> AB125062	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Cryomorphaceae</i>	86
X33	<i>Thalassospira lucentensis</i> AF358664	<i>Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae</i>	83

Metabolisch aktive Mikroorganismen in Wassersäule und auf X-Oil

Bei den in Abb. 3.20 c gezeigten Fingerprinting-Profilen der RNA-Proben handelt es sich in Bezug auf die Proben um ein exaktes Pendant zur Abbildung 3.20 a. Es sind dieselben Versuchstage und Marker aufgetragen. In diesem Falle sind – wie an den Markerbanden zu erkennen – die Banden insgesamt nicht soweit durch das Gel transportiert worden sind wie in den beiden Gelen, die zuvor präsentiert wurden. Eine solche Diskrepanz ist für die Methode DGGE nicht ungewöhnlich und kann beim Wechsel von Polyacrylamidlösungen, Puffern oder Agentien, die die Polymerisation starten, zustande kommen. Ein direkter Vergleich der Gele ist daher schwer und höchstens für die Markerbanden oder nach Sequenzierung einzelner Banden möglich.

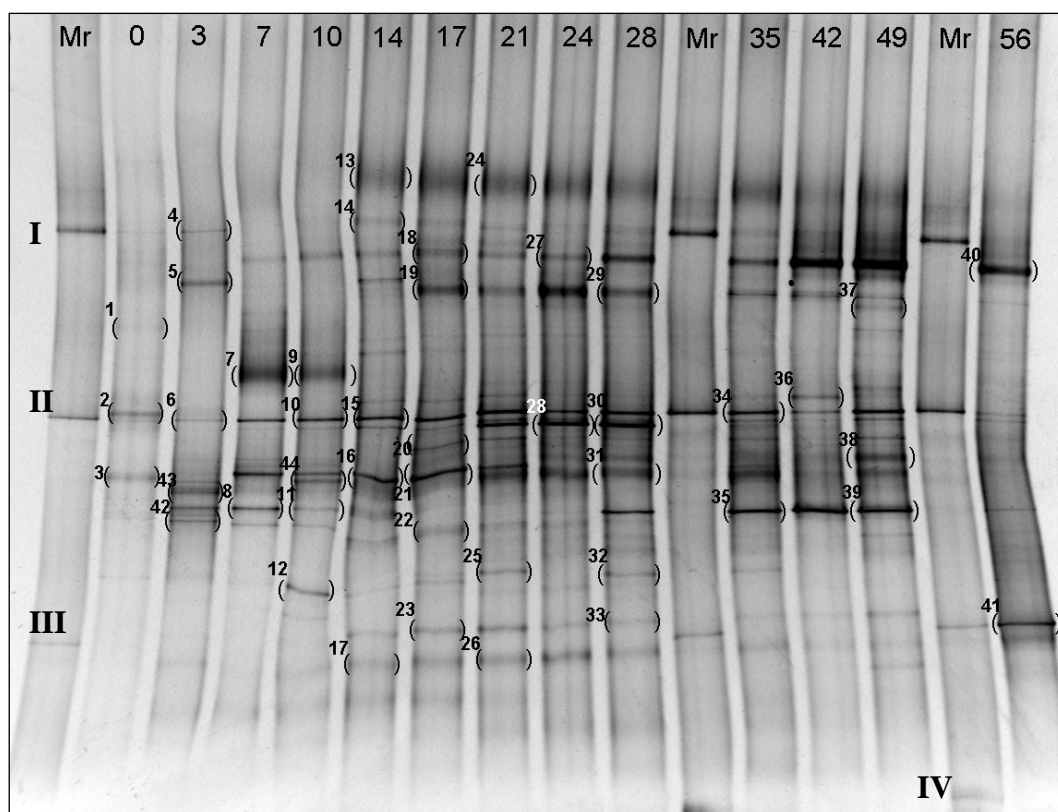


Abb. 3.20 c: Denaturierendes Gradientengel der RNA-Proben aus der Flüssigkeit des Mesokosmos I. Aufgetragen sind Proben der Versuchstage 0 bis 56. Der Versuchstag der jeweiligen Probe ist am oberen Ende des Gels aufgetragen. Die Beschriftung Mr steht für den oben beschriebenen Marker. Die im Marker enthaltenen Banden 70 (I), 73 (II), 80 (III) und 81(IV) sind gesondert in schwarzen römischen Zahlen aufgeführt. Die in runden Klammern markierten Banden wurden extrahiert und sequenziert. Diese Banden werden weiter unten unter den entsprechenden Nummern aufgeführt. Der Gradient des Gels reichte von 15 – 55% Formamid/Harnstoff.

Durch Verwendung der RNA der mikrobiellen Gemeinschaften kann eine bessere Aussage über die metabolisch aktiven Mikroorganismen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten gemacht werden. Interessanterweise gibt es kaum Ähnlichkeiten zu den in Abb. 3.20 a gezeigten Profilen.

Über den Versuchsverlauf gibt es mehrere Phasen, in denen die aktiven mikrobiellen Gemeinschaften eine hohe Ähnlichkeit in den Bandenprofilen aufzeigten und scheinbar eine ähnliche Zusammensetzung hatten. So traten zwischen Tag 0 und 7 starke Veränderungen auf; zwischen dem Versuchstag 14 und 28 schien hingegen eine stabile Gemeinschaft vorzuliegen. Wie bereits erwähnt könnten hierfür Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit und der Konkurrenzfähigkeit einzelner Bakterienarten verantwortlich sein. Ferner lagen unterschiedliche Substrate und Nährstoffkonzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor. So waren bereits nach einigen Tagen erhebliche Mengen an Stickstoff- und Phosphatverbindungen verfügbar, jedoch traten erst nach einigen Tagen Biofilme bzw. Biomasse sowie emulgiertes Öl als Nahrungsquelle auf. Zwischen Tag 24 und 35 wiederum veränderten sich die Bandenprofile, zeigten aber vom Versuchstag 35 bis 49 ähnliche Bandenmuster, was möglicherweise infolge der Verdünnung des Mesokosmos und der Senkung der Konzentration des Öls bzw. der Biomasse in der Flüssigkeit geschah.

Erst am Versuchstag 56 trat ein völlig unterschiedliches Bandenprofil auf. Wie bereits erwähnt, war zu diesem Zeitpunkt der überwiegende Teil des Öls verbraucht bzw. nicht mehr in der Mesokosmenflüssigkeit sichtbar.

Ebenso wie im Falle der Abb. 3.20 b ist eine Bande (R10, 15, 34) zu erkennen, deren Position im Gel sich mit der Markerbande II (73) für *A. borkumensis* deckt. Diese Bande ist von Tag 0 bis 56 deutlich in allen Bandenprofilen zu erkennen. Somit ist offensichtlich RNA dieses Organismus vorhanden, er ist also in der Mesokosmenflüssigkeit präsent und aktiv. Dies steht im Widerspruch zur Abb. 3.19 a, in der eine entsprechende Bande nur äusserst schwach am Versuchstag 25 und 28 sichtbar war. Eine Erklärung hierfür wäre eine geringe Zellzahl bei sehr hoher Aktivität.

Neben *A. borkumensis* treten auch die Banden R13 (24), R18 (27, 40), R20, R23 (33) sowie R17 (26) über den gesamten Versuchsablauf auf. Die zu diesen Banden gehörenden Mikroorganismen könnten eine wichtige Rolle für die Vorgänge in den Mesokosmen spielen und darüber hinaus auch an dem Abbau des Schweröls beteiligt sein. Zwei weitere Banden, die relativ spät während des Versuches auftraten waren Bande R19 (29) sowie R35 (39). Obwohl diese erst ab dem Versuchstag 17 bzw. 28 auftreten sind auch sie bis zum Ende des Versuches in einer hohen Intensität sichtbar. Die übrigen ausgeschnittenen Banden treten phasen- oder übergangsweise auf, könnten jedoch ebenso eine wichtige Rolle in den Mesokosmen spielen. Es kann im Einzelnen aber nicht auf jede Bande eingegangen werden. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tab. 3.IIb aufgelistet. Die Mehrzahl der Banden wurde mehrfach ausgeschnitten, um die Ergebnisse der Sequenzierung zu verifizieren.

Tab. 3.IIc: Vergleich der DNA-Sequenzen der aus dem Gel in Abb. 3.20c extrahierten Banden mit DNA-Sequenzen aus der Datenbank GenBank mittels BlastN. Angegeben sind die Nummer der in Abb. 3.20c aufgeführten Sequenzen der DNA aus den Banden sowie die ermittelte DNA-Sequenz (GenBank Accession Nr.) mit der höchsten prozentualen Ähnlichkeit. Zusätzlich angegeben sind die zu jeder Sequenz ermittelte Art sowie deren phylogenetische Zuordnung. Alle ausgeschnittenen Banden wurden mit dem forward- und dem reverse primer sequenziert und ein sequence assembly (Überlagerung und Korrektur der beiden Sequenzen) mittels der CAP-Subroutine des Programms Bioedit durchgeführt.

Bande Nr.	Spezies (größte Ähnlichkeit) Accession Nr. (GenBank)	Phylogenetische Gruppe	%
R2	<i>Roseobacter</i> sp. HJ105 DQ660384	<i>Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	97
R3	<i>Sulfitobacter pontiacus</i> AY159887	<i>Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	99
R4	<i>Crocinitomix catalasitica</i> AB078042	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Cryomorphaceae</i>	83
R5	<i>Arcobacter nitrofigilis</i> L14627	<i>Epsilonproteobacteria; Campylobacterales; Campylobacteraceae</i>	96
R6	<i>Marinobacterium jannaschii</i> AB006765	<i>Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae</i>	95
R7	<i>Maribacter goseongensis</i> DQ097520	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae</i>	94
R8	<i>Phaeobacter inhibens</i> AY177712	<i>Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	96
R9	<i>Cytophaga</i> sp. T-565 AJ551150	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Flexibacteraceae</i>	93
R10	<i>Bacillus subtilis</i> AB275363	<i>Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae</i>	95
R11	<i>Phaeobacter inhibens</i> AY177712	<i>Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	97
R12	<i>Roseovarius mucosus</i> AJ534215	<i>Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	99
R13	<i>Yeosuana aromativorans</i> AY682382	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae</i>	94
R14	<i>Thalassospira lucentensis</i> AF358664	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae</i>	83
R15	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 AM286690	<i>Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Alcanivoracaceae</i>	98
R16	<i>Sulfitobacter litoralis</i> DQ097527	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	98
R17	<i>Thalassospira lucentensis</i> AF358664	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae</i>	94
R19	<i>Microscilla furvescens</i> AB078079	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Flexibacteraceae</i>	85
R20	<i>Sulfitobacter</i> sp. HEL-46 AJ534227	<i>Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	77
R21	<i>Roseobacter denitrificans</i> EF512126	<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	98
R24	<i>Yeosuana aromativorans</i> AY682382	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae</i>	95
R25	<i>Roseovarius mucosus</i> AJ534215	<i>Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae</i>	93
R26	<i>Thalassospira lucentensis</i> AF358664	<i>Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae</i>	97
R27	<i>Psychroflexus torquis</i> DQ007442	<i>Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae</i>	96
R28	<i>Bacteriovorax</i> sp. BB3 DQ631715	<i>Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales; Bacteriovoracaceae</i>	99
R29	<i>Microscilla furvescens</i> AB078079	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Flexibacteraceae</i>	86

Bande Nr.	Spezies (größte Ähnlichkeit) Accession Nr. (GenBank)	Phylogenetische Gruppe	%
R30	<i>Bacteriovorax</i> sp. BB3 DQ631715	<i>Deltaproteobacteria</i> ; <i>Bdellovibrionales</i> ; <i>Bacteriovoracaceae</i>	99
R31	<i>Thalassobius gelatinovorius</i> AB289591	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Rhodobacteraceae</i>	83
R32	<i>Roseobacter</i> sp. TM1042 AY332663	<i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Rhodobacteraceae</i>	88
R33	<i>Pusillimonas noertemannii</i> AY695828	<i>Betaproteobacteria</i> ; <i>Burkholderiales</i> ; <i>Alcaligenaceae</i>	87
R34	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 AM286690	<i>Gammaproteobacteria</i> ; <i>Oceanospirillales</i> ; <i>Alcanivoracaceae</i>	96
R35	<i>Roseobacter</i> sp. B11 DQ659411	<i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Rhodobacteraceae</i>	99
R36	<i>Sphingomonas jaspsi</i> AB264131	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Sphingomonadales</i> ; <i>Sphingomonadaceae</i>	86
R37	<i>Saprospira grandis</i> AB088636	<i>Bacteroidetes</i> ; <i>Sphingobacteria</i> ; <i>Sphingobacteriales</i> ; <i>Saprospiraceae</i>	80
R38	<i>Lutibacterium anuloederans</i> AY026916	<i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Sphingomonadales</i> ; <i>Sphingomonadaceae</i>	98
R39	<i>Roseobacter</i> sp. B11 DQ659411	<i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Rhodobacteraceae</i>	99
R40	<i>Psychroflexus torquis</i> DQ007442	<i>Bacteroidetes</i> ; <i>Flavobacteria</i> ; <i>Flavobacteriales</i> ; <i>Flavobacteriaceae</i>	95
R41	<i>Ruegeria mobilis</i> AB255401	<i>Proteobacteria</i> ; <i>Alphaproteobacteria</i> ; <i>Rhodobacterales</i> ; <i>Rhodobacteraceae</i>	94
R42	<i>Marinomonas pontica</i> AY539835	<i>Gammaproteobacteria</i> ; <i>Oceanospirillales</i>	93

Die Ergebnisse der Sequenzierung der Banden R15 und 34 bestätigen zunächst die Anwesenheit von *A. borkumensis* sowie die Übereinstimmung der mit der Markerbande II (73). Somit kann festgehalten werden, dass dieser Organismus sowohl auf der Oberfläche des X-Oil über den gesamten Versuchsablauf vorhanden, ferner aber auch in der Mesokosmenflüssigkeit aktiv war. Während aber in der Mikrokosmenstudie die Frage bestand, ob *A. borkumensis* negativ vom Ölbindemittel X-Oil beeinflusst wird, zeigt sich nun, dass *Alcanivorax borkumensis* vielmehr ausschließlich auf der Oberfläche des Ölbindemittels anzutreffen ist. In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass im Mesokosmos neben auf X-Oil gebundenem Öl auch ein auf der Mesokosmenflüssigkeit schwimmender Ölteppich vorlag. Daher muss die Verwendung des Ölbindemittels offensichtlich einen positiven Einfluss auf die Wirkungsweise dieses ölabbauenden Bakteriums haben.

Mikrobieller Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen

Bereits während der Mikrokosmenstudie wurde anhand der Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse gezeigt, dass überraschenderweise Bestandteile der natürlichen Mikroflora des Meerwassers maßgeblich am Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe beteiligt sind. Die Fähigkeit eines Abbaus dieser Kohlenwasserstoffe ist für eine biotechnologische Anwendung von entscheidendem Interesse, da Schweröle bis zu 30% aus aromatischen Kohlenwasserstoffen bestehen. Im Falle der oben beschriebenen Mikrokosmenstudie konnten jedoch keine Mikroorganismen entdeckt oder kultiviert werden, die eventuell zum Abbau dieser Stoffe fähig sein konnten.

Im Falle der Mesokosmen jedoch zeigte die Bande R13 (24) in Abb. 3.20 c einen möglichen Zusammenhang mit dem Ölabbau, da sie wenige Tage nach dem Auftreten von *A. borkumensis* in Erscheinung tritt und bis zum Ende des Versuches sichtbar bleibt. Die Sequenzierung für diese Bande ergab eine 94 – 95%ige Ähnlichkeit der 16S rDNA-Sequenz zu *Yeosuana aromativorans*. Wie der Name dieses ungewöhnlichen Vertreters der Flavobakterien bereits andeutet, ist dieser Organismus in der Lage, aromatische Kohlenwasserstoffe abzubauen. Zum den verwertbaren Substraten dieses Mikroorganismus zählen unter anderem Naphtalen, Phenanthren sowie andere polyaromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) ^{58, 99}. Dies ist für Flavobakterien relativ ungewöhnlich, da diese Organismen in der Regel ein auf wenige Kohlenstoffquellen – in der Regel einfache Zucker – limitiertes Substratspektrum haben. Im DGGE-Gel in Abb. 3.20 c zeichnet sich *Yeosuana aromativorans* insbesondere durch eine unscharfe Bande aus, die sich knapp über der Markerbande I (70) befindet. Diese charakteristische Bande ist ebenfalls in den Abb. 3.20 a und b zu beobachten, jedoch ist keine Extraktion und Analyse der Banden erfolgt oder gelungen. Es deutet sich jedoch an, dass dieser Organismus sowohl in der Mesokosmenflüssigkeit als auch in der Umgebung oder auf der Oberfläche des X-Oil vorhanden ist.

Neben *Y. aromativorans* konnte ein weiterer Organismus entdeckt werden, der mit einem Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen in Verbindung stehen könnte: Die aus der Bande R38 extrahierte DNA-Sequenz weist eine 98%ige Ähnlichkeit zur 16S rDNA von *Lutibacterium anuloderans* (anulus: lat. Ring; edere: lat. Essen); dieses Bakterium gehört zu den *Alphaproteobakterien*, genauer gesagt zur Familie *Sphingomonadaceae*. Es wurde in einer Anreicherungskultur aromatischer kohlenwasserstoffabbauender Bakterien in Verbindung mit *Cycloclasticus* sp. nachgewiesen und ist in der Lage Pyren und Benzopyren abzubauen ¹⁰⁰.

Eine weitere Gruppe auffälliger Banden, die über den gesamten Versuchsablauf auftrat wurde bereits oben erwähnt; diese Banden konnten *Thalassospira lucentensis* (R17), *Psychroflexus torquis* (R27), *Sulfitobacter* sp. (R20) und *Pusillimonas noertemannii*(R33) mit einer hohen Ähnlichkeit zugeordnet werden.

Dabei wurden Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit von *Sulfitobacter* sp. und *Thalassospira lucentensis* bereits im Falle der Mikrokosmenstudie entdeckt. Im Falle von *Sulfitobacter* sp. wurden im Gel in Abb. 3.20 c noch drei weitere Sequenzen entdeckt, die eine Ähnlichkeit mit diesem Organismus haben. Die meisten Vertreter der Gattung *Sulfitobacter* spielen eine Rolle bei der Rückführung von Schwefelverbindungen in den Schwefelkreislauf ^{14, 92, 94}, es ist aber auch ein Zusammenhang mit dem hohen Schwefelgehalt des Schweröls denkbar. Im Falle von *T. lucentensis* wurde bereits während der Mikrokosmenstudie vermutet, es könne ein Zusammenhang mit der hohen Menge an Biomasse oder Stickstoff- und Phosphatverbindungen vorliegen, da *T. lucentensis* nicht in der Lage ist Kohlenwasserstoffe zu verwerten. In der Tat weist die DNA-Sequenz der Bande R17 eine 98%ige Ähnlichkeit zu *T. denitrificans* auf, die entsprechende Referenz wurde jedoch noch nicht publiziert. In zwei unabhängigen Studien wurde *T. lucentensis* in einem ölverschmutzten Salzwassertümpel, im zweiten Fall in einer mit Salzwasser gespülten Ölpipeline nachgewiesen. Obwohl *T. lucentensis* keine Fähigkeiten zum Abbau von Kohlenwasserstoffen besitzt, scheint es in einer Verbindung mit den eigentlichen ölabbauenden Mikroorganismen zu stehen ^{89 - 91}.

Bei *P. noertemannii* und *P. torquis* handelt es sich um Organismen, die zuvor nicht in der Mikrokosmenstudie entdeckt wurde. Bei ersterem handelt es sich um einen Vertreter der

Betaproteobacteria, bei letzterem wiederum um einen der Flavobakterien. *Psychroflexus torquis* ist ein in der Antarktis entdecktes psychrophiles Bakterium, das die Fähigkeit besitzt in Biofilmen an den Grenzflächen von Eis und Salzwasser zu wachsen. Es sind keine Fähigkeiten des Abbaus von Kohlenwasserstoffen bekannt, ferner ist eine maximale Wachstumstemperatur von circa 20°C für *P. torquis* beschrieben. Diese Temperatur wurde im Mesokosmenbecken I erreicht und zeitweise sogar überschritten.

Das Betaproteobakterium *Pusillomonas nortemannii* wiederum wurde in Mikrokosmen, die aus Sediment und Wasser des Elbeästuars, welches mit Salicylat versetzt wurde, angereichert und isoliert. Neben einer Anzahl von Zuckern und Aminosäuren ist dieser Mikroorganismus in der Lage eine Zahl von aromatischen Carbonsäuren wie zum Beispiel Salicylate und Benzoate zu verwerten¹⁰¹. Diese Eigenschaft ist insofern hochinteressant, da aromatische Kohlenwasserstoffe häufig zu oder auf dem Weg über aromatische Carbonsäuren abgebaut werden.

Bei der überwiegenden Mehrheit der weiteren ermittelten Sequenzen handelt es sich um Mitglieder der Alpha- oder Gammaproteobakterien sowie Vertreter der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe. Mit Ausnahme zweier Sequenzen sind hier keine auffälligen Organismen entdeckt worden. Die beiden erwähnten Sequenzen jedoch zeigen eine 99%tige Homologie zu dem Deltaproteobakterium *Bacteriovorax sp.* Es handelt sich dabei um einen Verwandten des allgemein bekannten räuberischen Bakteriums *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Bdellovibrio sp.* sind in nahezu allen Ökosystemen, in denen große Mengen gramnegativer Bakterien vorliegen, nachzuweisen. Es handelt sich hierbei um einen Mikroorganismus, der ähnlich wie jeder räuberische Organismus die Zahl der Beute kontrolliert und begrenzt. Dieses Bakterium übt somit einen stabilisierenden Effekt auf die mikrobiellen Gemeinschaften aus³⁵.

Für den hier vorliegenden Versuch ist die Anwesenheit von *Bacteriovorax sp.* durchaus überraschend, zumal mit den verschiedenen oben beschriebenen Protozoen bereits eine Kontrolle der Biomasse durch Grazing bestand. Die Banden 28 und 30 sind erstaunlicherweise ausschliesslich an den Versuchstagen 21 bis 28 und in sehr geringer Intensität am Versuchstag 35 zu erkennen. In diesem Zeitraum des Versuches lag ein leichte Zunahme der Zellzahl, ein Steigerung der Respiration, jedoch parallel dazu eine relativ geringe Konzentration an Protozoen vor. Da die Zellen von *Bdellovibrio sp.* und *Bacteriovorax sp.* extrem klein sind, ist es nicht möglich, dass diese durch die Zellzählung erfasst wurden und somit in die Zellzahl mit einbezogen wurden.

Es liegt nahe, dass durch das Fehlen der Protozoen in dem genannten Zeitraum ein erneutes Wachstum von Bakterien einsetzte, welches parallel dazu ein Wachstum von *Bacteriovorax sp.* ohne Konkurrenz durch die Ciliaten und Amöben stimulierte. Offensichtlich wurde die Zunahme der Zellzahl nur geringfügig gebremst, was möglicherweise auf eine Unzugänglichkeit der Beute, beispielsweise durch den Einschluss in Biofilme oder durch die Lokalisierung in für *Bacteriovorax sp.* unzugänglichen Bereichen wie den weitestgehend anaeroben Schwimmbarrieren zurückzuführen ist. Somit hätten nur frei lebende Zellen von *Bacteriovorax sp.* angegriffen werden können. In Anwesenheit von Protozoen hingegen wird *Bacteriovorax sp.* vermutlich ausserhalb und als Parasit innerhalb der Zellen zusammen mit diesen zur Beute dieser Predatoren.

3.21 Mesokosmenstudie - Phylogenetische Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften

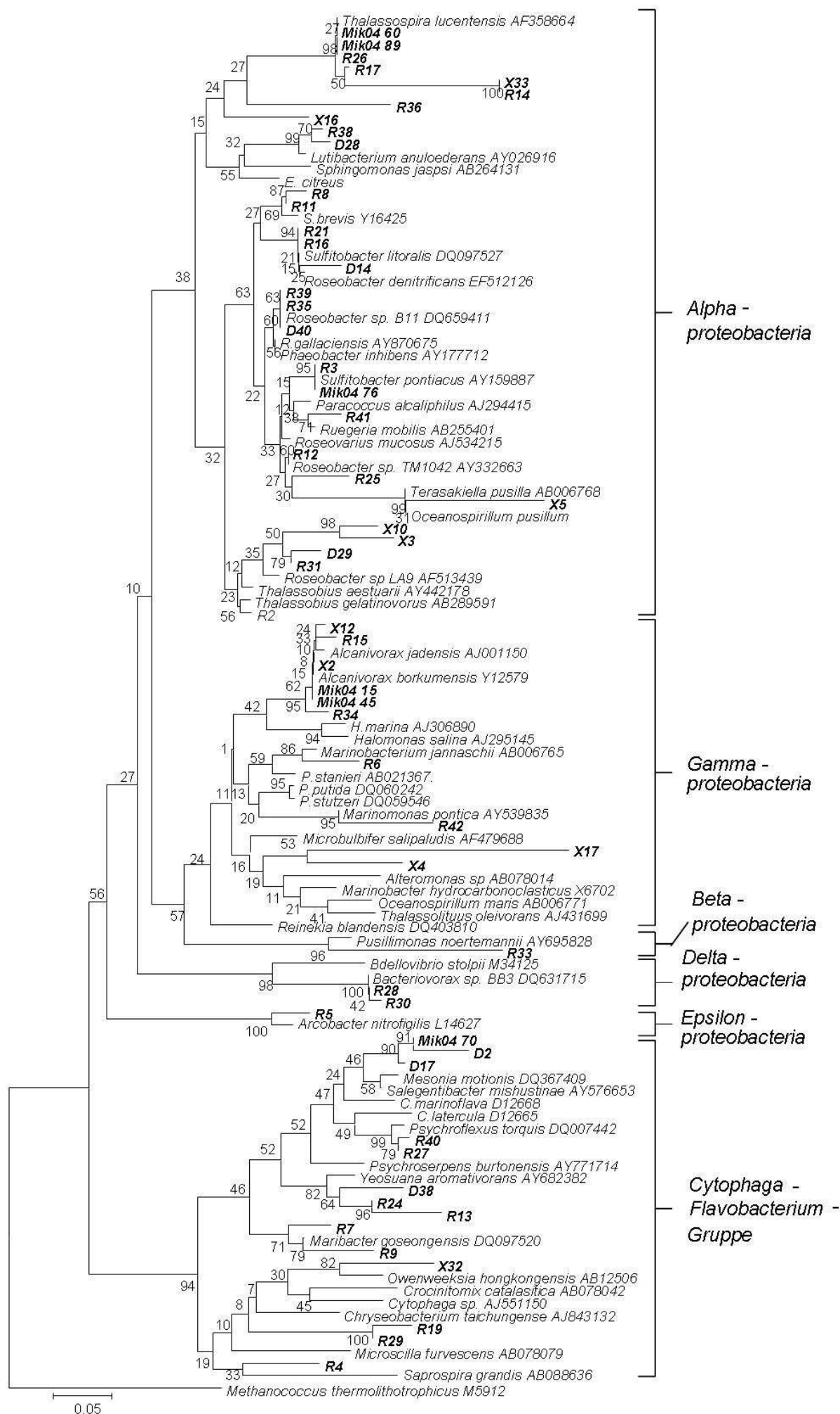
In der Abbildung 3.21a ist ein phylogenetischer Baum als Überblick über sämtliche aus den oben präsentierten Gelen ermittelten DNA-Sequenzen zu erkennen. Dabei wurden Vertreter von vier Gruppen der Proteobakterien, der Gruppen Alpha, Beta, Gamma und Delta, sowie der *Cytophaga-Flavobakterium*-Gruppe nachgewiesen.

Besonders auffällig sind einige Sequenzen, die äusserst große Längen der Äste aufweisen, zum Beispiel die Sequenzen X 5 oder X14 bzw. R33. In diesen Fällen handelt es sich um Sequenzen, die eine hohe Ähnlichkeit zu unkultivierbaren Bakterien oder unpublizierten Sequenzen aufweisen, welche im Baum nicht aufgeführt werden. Eine andere Erklärung hierfür wären experimentell bedingte Abweichungen der ermittelten Sequenzen. Dies wurde jedoch durch die Sequenzierung mittels beider Primer minimiert.

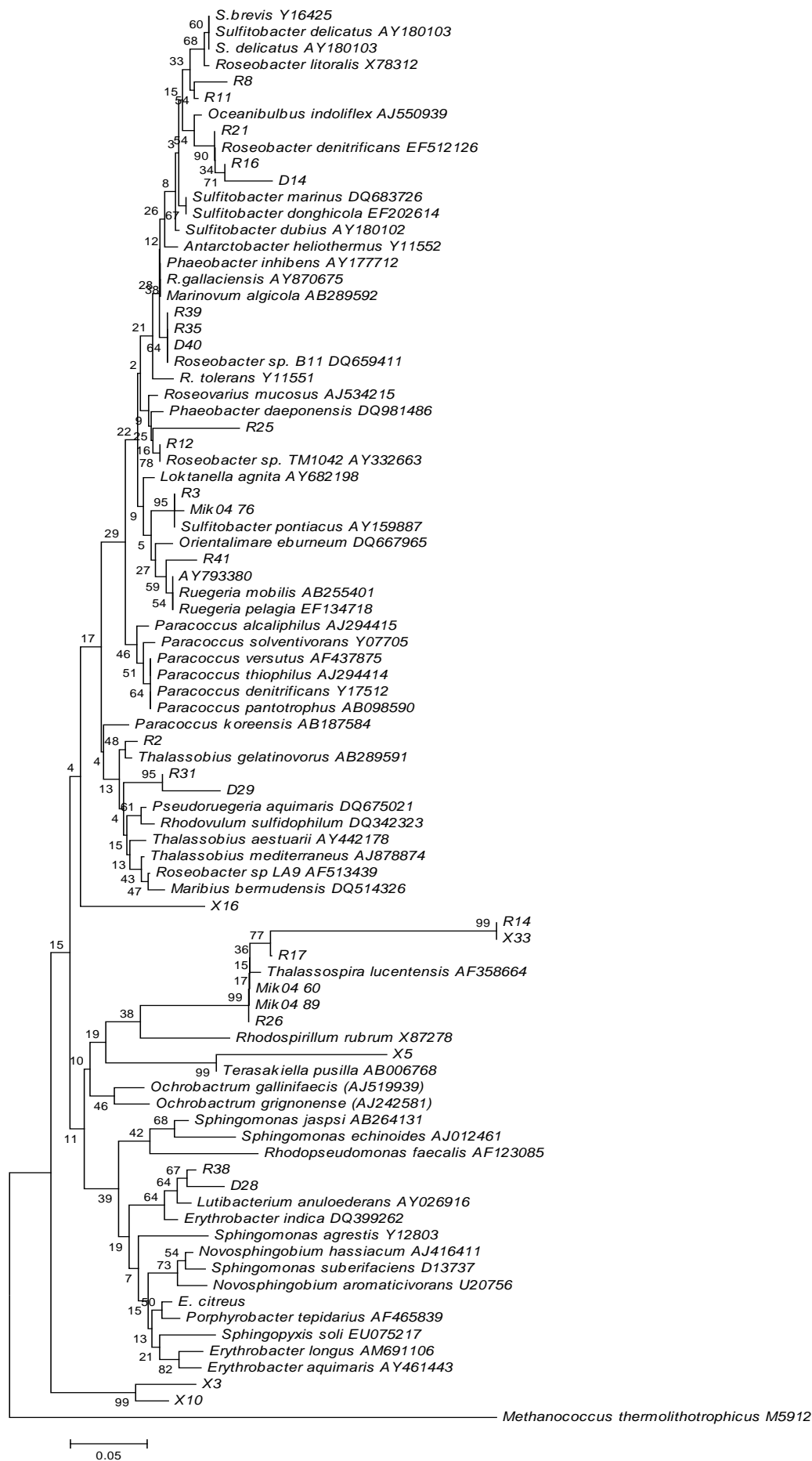
Bei der Betrachtung des phylogenetischen Baumes fällt auf, dass besonders viele der ermittelten Sequenzen zu den Alpha-, den Gammaproteobakterien sowie der *Cytophaga-Flavobakterium*-Gruppe zugeordnet werden können. Die erstere sowie die letztere Gruppe stellen dabei den Großteil der natürlichen Flora des Meeres. Besonders häufig werden im Meerwasser Mitglieder der Familien *Roseobacteriaceae* sowie *Sulfitobacteriaceae* nachgewiesen, was auch in diesem Experiment der Fall war. Darüber hinaus wurde eine Anzahl an Banden *Thalassospira lucentensis* zugeordnet, einem Organismus, der wie bereits erwähnt häufig in Verbindung mit Ölverschmutzungen auftritt, jedoch keine Kohlenwasserstoffe abbauen kann. Insgesamt sechs Sequenzen stehen in einer engen Verbindung mit *T.lucentensis*, wobei zwei dieser Sequenzen aus der oben gezeigten Mikrokosmenstudie stammen.

Unter den Sequenzen, die in die *Cytophaga-Flavobakterium*-Gruppe eingeordnet werden müssen, tritt vor allem das kohlenwasserstoffabbauende Bakterium *Yeosuana aromativorans* hervor. Drei der Sequenzen zeigen eine Verwandtschaft zu diesem Organismus. Eine Zahl anderer Banden wurde ebenfalls verschiedenen Mitgliedern dieser Gruppe zugeordnet. Die physiologisch vielseitigen *Gammaproteobacteria* hingegen sind im Falle von Ölverschmutzungen in verschiedensten Habitaten nachgewiesen worden. Besonders viele der extrahierten Banden konnten *A. borkumensis* zugeordnet werden, wobei zwei Sequenzen eine höhere Ähnlichkeit zur Schwesterart *Alcanivorax jadensis*, die ebenfalls in der deutschen Bucht isoliert wurde, aufweisen.

Da diese drei dominanten Gruppierungen von Mikroorganismen eine wichtige Rolle für den Ölabbau im Mesokosmos I spielten, wurden detaillierte phylogenetischer Bäume der Alpha-, Gammaproteobakterien sowie der *Cytophaga-Flavobakterium*-Gruppe mittels der oben beschriebenen Neighbour-joining-Methode durch das Programm MEGA 4.0 angefertigt. Zusätzlich wurde ein phylogenetischer Baum für die Bande R 33 angefertigt, die mit *Pusillimonas noertemannii* einem interessanten Mikroorganismus, der ebenfalls komplexe Kohlenwasserstoffe abbauen kann, zugeordnet werden konnte¹⁰¹.



Vorherige Seite: Abb. 3.21a: Phylogenetischer Baum der in den DGGE-Gelen aus Abb. 3.20 a – c extrahierten Banden. Mit D bezeichnete Banden entstammen dem Gel in Abb. 3.20a, mit X bezeichnete aus Abb. 3.20b und mit R bezeichnete dem Gel in Abb. 3.20c. Bereits publizierte Referenzsequenzen wurden der Gendatenbank Nucleotide, bzw. CoreNucleotide entnommen und Accession Nr. der jeweiligen Sequenz beigefügt. Als Outgroup wurde die 16S rDNA-Sequenz von *Methanococcus thermolithotrophicus* beigefügt. Für die Konstruktion der phylogenetischen Bäume wurde das Programm Mega 4.0⁸⁵ verwendet. Es wurde ein Bootstrapping mit 1000 Datensätzen durchgeführt, gefolgt von einer Neighbour-joining-Analyse unter Verwendung des Kimura-2-Parameters.



Vorherige Seite: Abb. 3.20b; phylogenetischer Baum der Mitglieder der Alphaproteobakterien unter den aus den Gelen in Abb. 3.20a – c extrahierten Banden. Sämtliche mit D bezeichneten Banden entstammen dem Gel in Abb. 3.20a, jene mit X bezeichneten aus Abb. 3.20b und die mit R bezeichneten Sequenzen dem Gel in Abb. 3.20c. Referenzsequenzen wurden der Gendatenbank Nucleotide, bzw. CoreNucleotide entnommen. Es handelt sich dabei um bereits publizierte Sequenzen, deren Accession Nr. der jeweiligen Sequenz beigefügt wurde. Als Outgroup wurde die 16S rDNA-Sequenz des Archaeobakteriums *Methanococcus thermolithotrophicus* beigefügt. Für die Konstruktion der phylogenetischen Bäume wurde das Programm Mega 4.0⁸⁵ verwendet. Es wurde ein Bootstrapping mit 1000 Datensätzen durchgeführt, gefolgt von einer Neighbour-joining-Analyse unter Verwendung des Kimura-2-Parameters.

Wie bereits erwähnt wurde eine Vielzahl von Banden dem spiralförmigen *Alphaproteobacterium Thalassospira lucentensis* zugeordnet. Eine Zahl von Sequenzen, die in der Mikrokosmenstudie ermittelt wurden, zeigen, dass dieses Bakterium bereits während dieser Versuche vorhanden war. In Einklang mit einer Zahl weiterer Studien deutet dies auf die potenzielle Rolle für bzw. beim Abbau von Öl im Meer an. Die Sequenzen R14 und X 33 zeigen eine gewisse Distanz zu den übrigen Sequenzen auf. Hierbei könnte es durch Kontamination der DNA in einer Bande mit solcher aus einer anderen Bande im Gel zu einer Überlagerung der Sequenzen („Chimäre“) gekommen sein. Eine Zahl weiterer Banden weist ein solche phylogenetische Distanz auf, zum Beispiel die Sequenzen X3, X 5 und X 10. In diesen Fällen lag eine hohe Ähnlichkeit zu unkultivierten und nicht näher identifizierten Sequenzen der Datenbank vor, diese waren jedoch bislang nicht publiziert. Es liegt daher nahe, dass es sich um bislang unbekannte Organismen handelt.

Die Mehrzahl der ermittelten Sequenzen ist der Familie *Rhodobacteriaceae* zugeordnet worden, insbesondere den Gattungen *Sulfitobacter*, *Roseobacter* und *Phaeobacter*. Diese Familie stellt einen großen Teil der natürlichen Flora des Meeres. Ihre Mitglieder werden häufig in Mikrokosmenstudien oder durch kulturunabhängige Methoden in Meerwasser aller Breiten und unter verschiedensten Versuchsbedingungen angetroffen⁹⁵. Besonders bemerkenswert sind die Sequenzen D 14 und R 16, die in enger Verwandtschaft zu *Roseobacter denitrificans* stehen, einem wie der Name schon sagt zur Denitrifikation befähigten Vertreter dieser Art. In der Tat treten die zu den Sequenzen gehörigen Banden während einer Phase großer Sauerstoffzehrung auf, in der dieser Stoffwechselweg von großem Vorteil sein kann. Wie bereits oben erwähnt konnten die Sequenzen der Banden D 28 und R38 in ein enges Verwandtschaftsverhältnis mit dem kohlenwasserstoffabbauenden Bakterium *Lutibacterium annuloederans* gebracht werden.

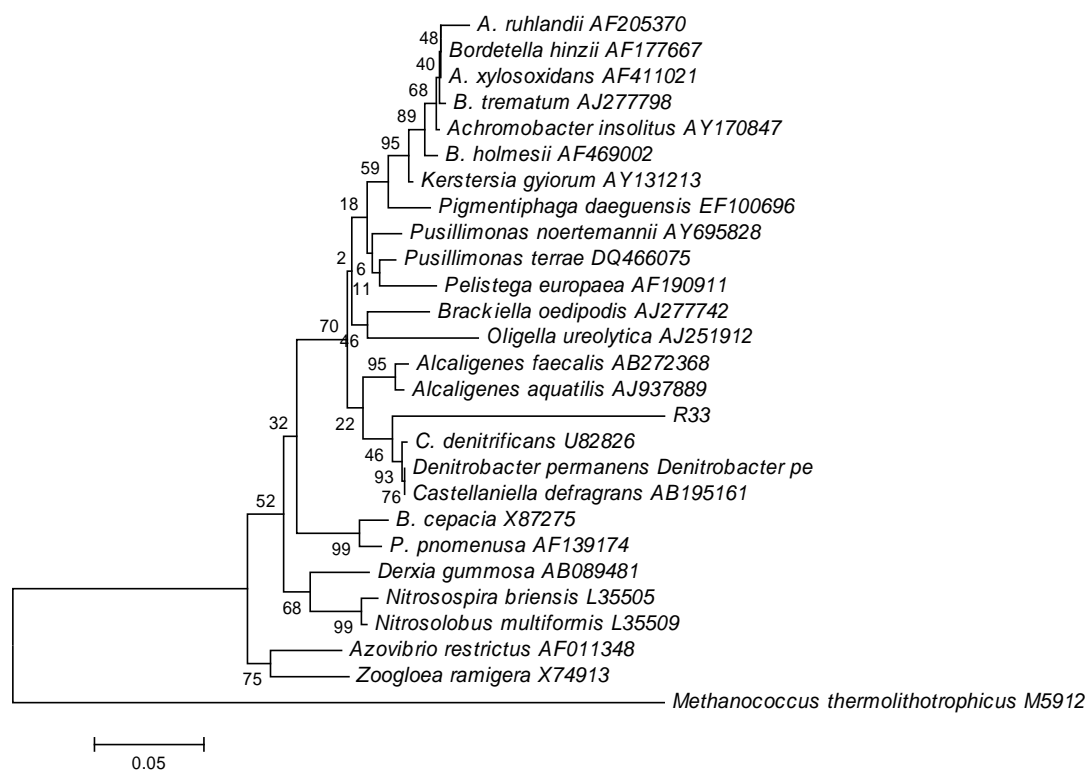


Abb. 3.21c; phylogenetischer Baum verschiedener Mitglieder der Betaproteobakterien in Bezug zu der aus dem Gel in Abb. 3.20c extrahierten Bande R33. Referenzsequenzen wurden der Gendatenbank Nucleotide, bzw. CoreNucleotide entnommen. Es handelt sich dabei um bereits publizierte Sequenzen, deren Accession Nr. der jeweiligen Sequenz beigelegt wurde. Als Outgroup wurde die 16S rDNA-Sequenz des Archaeobakteriums *Methanococcus thermolithotrophicus* beigelegt. Für die Konstruktion der phylogenetischen Bäume wurde das Programm Mega 4.0 verwendet. Es wurde ein Bootstrapping mit 1000 Datensätzen durchgeführt, gefolgt von einer Neighbour-joining-Analyse unter Verwendung des Kimura-2-Parameters.

Unter den aus allen Gelen extrahierten Banden und 16S rDNA-Sequenzen konnte einige mit Organismen in Verbindung gebracht werden, die in der Lage sind, Schadstoffe, insbesondere aromatische oder halogenierte Kohlenwasserstoffe abzubauen. Zu diesen Banden zählte R33, die eine hohe Ähnlichkeit zu *Pusillimonas noertemannii* aufwies. Dieses Bakterium aus der Familie der *Alcaligenaceae* wurde aus einer Anreicherungskultur von Sediment des Elbeästuars, welches mit 6-Aminonaphtalen-2-sulfonat behandelt wurde, isoliert. Es verfügt über eine Dioxygenase, welche in der Lage ist, die Ringsysteme aromatischer Kohlenwasserstoffe zu öffnen ¹⁰¹.

Eine genaue phylogenetische Analyse der Sequenz R33 in Relation zu verschiedenen Referenzsequenzen der *Betaproteobacteria* deutet jedoch auf andere Verwandtschaftsverhältnisse hin: Wie die Abb. 3.21c zeigt, besteht ein engeres Verwandtschaftsverhältnis zwischen dem Organismus, der Bande R33 verursachte und den Organismen *Castellaniella denitrificans* sowie *Denitrobacter permanens*. Ebenso wie *P. noertemannii* zählen diese Organismen zur *Alcaligenaceae*, jedoch sind keine Fähigkeiten dieser Organismen zum Abbau von komplexen Kohlenwasserstoffen bekannt. Interessanterweise sind auch wie im Falle des weiter oben beschriebenen *Roseobacter denitrificans*

Fähigkeiten zur Denitrifikation vorhanden, was auf die hohen Nitratkonzentrationen sowie Respirationsraten zurückzuführen sein könnte.

Ebenso wie für die Alpha- und Betaproteobakterien wurde ein detaillierter phylogenetischer Baum der Gammaproteobakterien angefertigt. Diese Organismen sind für den marinen Abbau von Kohlenwasserstoffen von entscheidender Bedeutung; zahlreiche Studien, die sowohl Fallstudien von Havarien als auch Mikrokosmenstudien einschließen berichten von einer Verschiebung der mikrobiellen Gemeinschaften zu Lasten der Alphaproteobakterien und zugunsten der Gammaproteobakterien ^{27, 36, 37, 52, 102}. Darüber hinaus stellen die Gammaproteobakterien eine spezialisierte Gruppe von Bakterien – die so genannten marinen hydrocarbonoclastischen Bakterien – bei denen es sich in der Regel um obligate ölabbauende bzw. Kohlenwasserstoffe verwertende Mikroorganismen mit reduziertem Genom und besonderen Eigenschaften, die die Bioverfügbarkeit erhöhen, handelt.

Zu diesen hydrocarbonoclastischen Bakterien zählt unter anderem *Alcanivorax borkumensis*. In der Tat konnten vier der Banden in den Abbildungen 3.20b und c diesem Organismus zugeordnet werden. Aufgrund der geringen phylogenetischen Distanz ist davon auszugehen, dass es sich um den Stamm *Alcanivorax borkumensis* SK2 handelt, der nicht nur aus Meerwasser der deutschen Bucht isoliert, sondern auch bereits während der Mikrokosmenstudie nachgewiesen wurde ⁵⁴. Zwei weitere Sequenzen wurden verschiedenen Spezies der Gattung *Marinobacter* zugeordnet. Diese Vertreter der Familie *Alteromonadaceae* zählen ebenso wie die Familie *Rhodobacteriaceae* zur natürlichen Flora des Meeres ⁹⁵. Neben *A. borkumensis* konnte eine Sequenz, X17, einem weiteren marinen hydrocarbonoclastischen Bakterium – *Thalassolituus oleivorans* – zugeordnet werden. Dieser Mikroorganismus teilt die ökologische Nische von *A. borkumensis*, wurde jedoch bisweilen in wärmeren Gewässern, zum Beispiel im Mittelmeer nachgewiesen ^{58, 62}. Die Abundanz zweier ölabbauender Mikroorganismen im Mesokosmos zeigt dabei nicht nur die Abbauleistung des Mesokosmos, sondern auch das biotechnologische Potenzial des hierfür verwendeten Meerwassers.

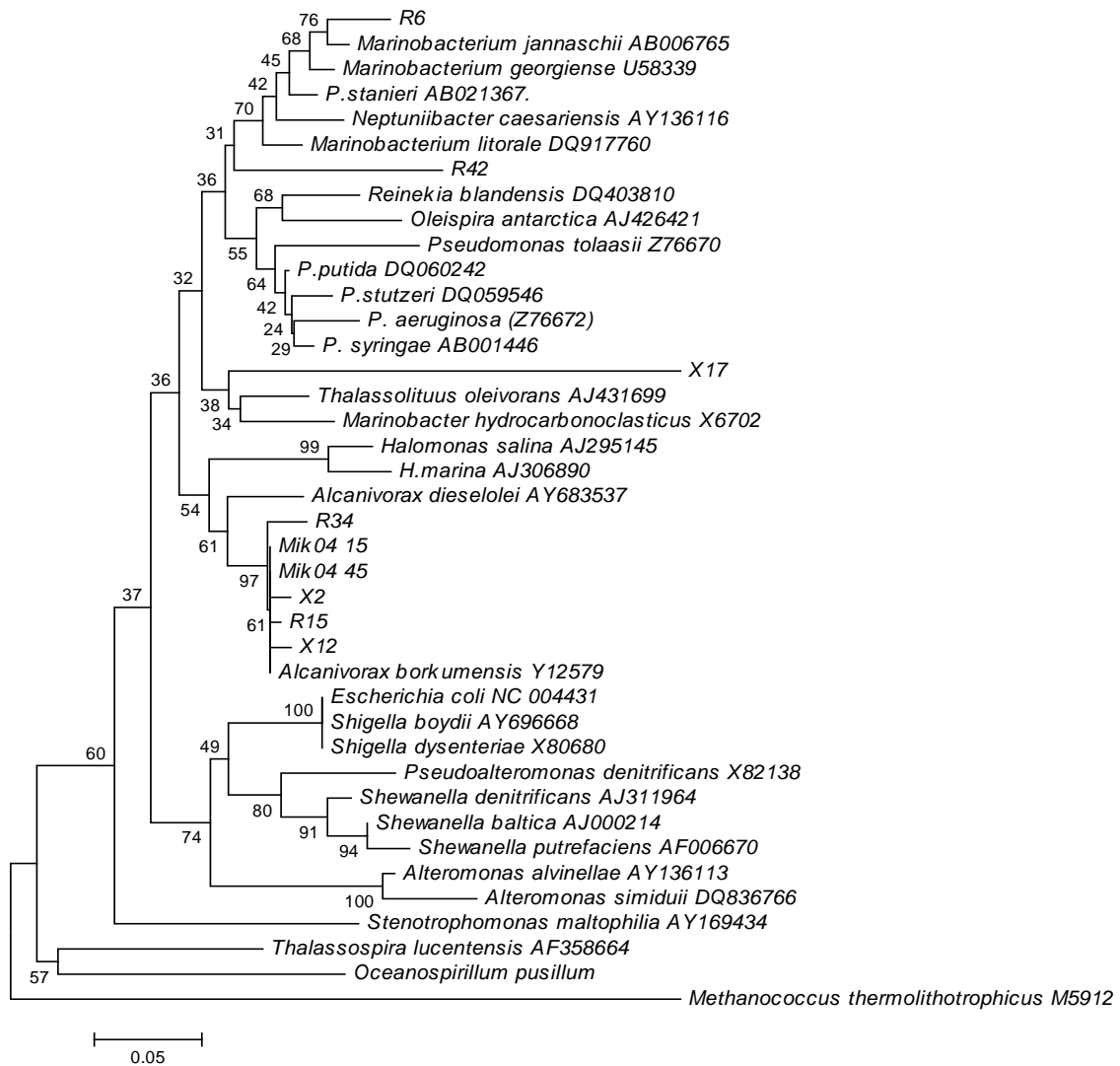


Abb. 3.21d; phylogenetischer Baum der Mitglieder der Gammaproteobakterien unter den aus den Gelen in Abb. 3.20a – c extrahierten Banden. Sämtliche mit D bezeichneten Banden entstammen dem Gel in Abb. 3.20a, jene mit X bezeichneten aus Abb. 3.20b und die mit R bezeichneten Sequenzen dem Gel in Abb. 3.20c. Referenzsequenzen wurden der Gendatenbank Nucleotide, bzw. CoreNucleotide entnommen. Es handelt sich dabei um bereits publizierte Sequenzen von Organismen mit validiert publizierten Namen, deren Accession Nr. der jeweiligen Sequenz beigefügt wurde. Als Outgroup wurde die 16S rDNA-Sequenz des Archaeobakteriums *Methanococcus thermolithotrophicus* beigefügt. Für die Konstruktion der phylogenetischen Bäume wurde das Programm Mega 4.0 verwendet. Es wurde ein Bootstrapping mit 1000 Datensätzen durchgeführt, gefolgt von einer Neighbour-joining-Analyse unter Verwendung des Kimura-2-Parameters.

Wie auch die Alphaproteobakterien stellen Vertreter der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe einen wesentlichen Teil der natürlichen Flora des Meerwassers. Von entscheidender Bedeutung, vor allem an Felsküsten mit ausgedehnten Tangwäldern wie zum Beispiel am Helgoländer Felssockel, sind dabei die Gattungen *Cytophaga* und *Cellulophaga*. Es handelt sich dabei um Bakterien, die mithilfe von membranständigen Cellulasen und Exoenzymen pflanzliches Material, hauptsächlich Cellulose von Braunalgen wie *Laminaria sp.*, abbauen können. Dies ist ein sehr wichtiger Prozess, da durch Stürme im Frühjahr und Sommer unter Umständen enorme Mengen an Braunalgen vom Felssockel abgetrennt werden.

Da Algen unter Umständen gewisse Mengen an Phenolen oder auch polyaromatischen Verbindungen enthalten, ist es nicht verwunderlich, dass einige wenige Vertreter der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe Fähigkeiten zum Abbau dieser Verbindungen entwickelt haben. Einer dieser Organismen ist *Yeosuana aromativorans*, ein Mitglied der Familie *Flavobacteriaceae*, welches in einer Anreicherungskultur aus Meeressediment mit Benzopyren, einem polyaromatischen krebserregenden Kohlenwasserstoff, isoliert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Organismus eine Zahl von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen abzubauen vermag. Drei der Sequenzen, D38, R13 und R24 aus der Mesokosmenstudie zeigen eine Verwandtschaft mit diesem Organismus. Eine vergleichbare Bande ist auch in den Proben von der Oberfläche des Ölbindemittels X-Oil zu erkennen. Anhand des phylogentischen Baums ist jedoch eine gewisse Distanz zu *Yeosuana aromativorans* und dessen nächsten Verwandten zu erkennen. Dies könnte durch Qualitätsprobleme der Sequenzierungsreaktion bedingt sein.

Die Mehrheit der in Abb. 3.21d aufgetragenen Sequenzen steht in Beziehung zur Familie *Flavobacteriaceae*. Besonders bemerkenswert sind dabei die Sequenzen R27 und R40. Der nächste Verwandte dieser Organismen gehört zur Gattung *Psychroflexus*, einem psychrophilen Organismus, der oberhalb von 15°C kaum Wachstum zeigt. Dieses Auftreten könnte mit einer langen und sehr kalten Winterperiode im Frühjahr 2006 zusammenhängen, die sich bis in den späten April dieses Jahres hinzog.

Die Sequenzen R19 und R29, die zunächst *Oleispira antarctica* zugeordnet wurden, zeigten in diesem detaillierten phylogentischen Baum eine entfernte Verwandtschaft zu *Flexibater filiformis* und *Saprospira grandis*. Es handelt sich jedoch vermutlich um eine bislang unentdeckte Spezies, deren Eigenschaften unbekannt sind.

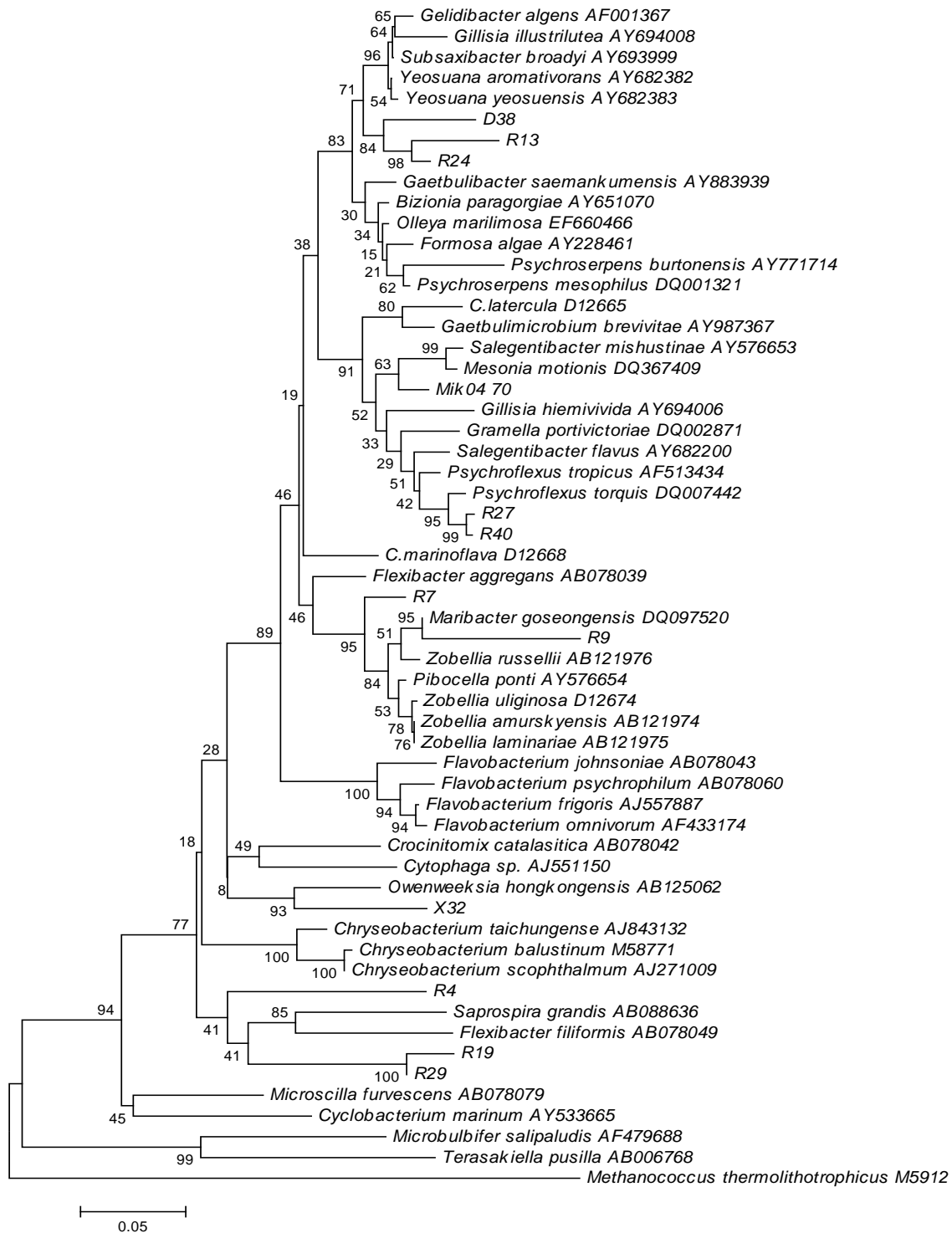


Abb. 3.21e; phylogenetischer Baum der Mitglieder der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe unter den aus den Gelen in Abb. 3.20a – c extrahierten Banden. Sämtliche mit D bezeichneten Banden entstammen dem Gel in Abb. 3.20a, jene mit X bezeichneten aus Abb. 3.20b und die mit R bezeichneten Sequenzen dem Gel in Abb. 3.20c. Referenzsequenzen wurden der Gendatenbank Nucleotide, bzw. CoreNucleotide entnommen. Es handelt sich dabei um bereits publizierte Sequenzen, deren Accession Nr. der jeweiligen Sequenz beigelegt wurde. Als Outgroup wurde die 16S rDNA-Sequenz des Archaeobakteriums *Methanococcus thermolithotrophicus* beigelegt. Für die Konstruktion der phylogenetischen Bäume wurde das Programm Mega 4.0 verwendet. Es wurde ein Bootstrapping mit 1000 Datensätzen durchgeführt, gefolgt von einer Neighbour-joining-Analyse unter Verwendung des Kimura-2-Parameters.

3.22 Mesokosmenstudie - Analyse der eukaryotischen Gemeinschaften mittels DGGE

Für die Identifikation von Mikrozooplankton und Protozoen werden auch in der modernen Biologie weiterhin vielfach morphologische Besonderheiten der Einzeller verwendet. Dabei werden nach einer Isolierung und Kultivierung lichtmikroskopische und häufig auch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Kriterien wie zum Beispiel Zellform und -größe, Lage und Anzahl der Cillien und Cirren im Falle von Ciliaten und Flagellen bei Flagellaten, Besonderheiten des Cytoplasmas und Bewegungsschemata bei Amöben werden dabei angeführt. Obwohl eine Vielzahl an Bestimmungsschlüsseln existieren und diese sogar zum Teil frei im Internet verfügbar sind, können Klassifikation und Identifikation anhand der Morphologie nur von Experten mit jahrelanger Erfahrung auf diesem Gebiet vorgenommen werden.

Neben der Schwierigkeiten bei der Identifikation anhand der Morphologie treten auch weitere Probleme bei der Analyse der eukaryotischen Gemeinschaften in den Mesokosmen auf: Im Meerwasser wird ein erheblicher Teil der eukaryotischen Diversität durch das Picozooplankton gestellt. Dabei handelt es sich um Nanoflagellaten, die sich in ihrer Größe nur unwesentlich von Bakterien unterscheiden. Diese können mit den Mitteln der Lichtmikroskopie nur sehr schwer entdeckt werden. Um die Gesamtheit der Diversität der Protisten in diesem Mesokosmenversuch zu bestimmen und gleichzeitig eine eindeutige Identifikation der einzelnen Eukaryoten vorzunehmen, wurde eine denaturierende Gradientengelelektrophorese nach Diéz et al. durchgeführt⁷⁷. Es handelt sich dabei um dasselbe Verfahren, das auch für die prokaryotischen Gemeinschaften eingesetzt wurde. Jedoch wurden spezielle Primer eingesetzt, die ein circa 500 Basenpaare langes Fragment der 18S rDNA der Protozoen amplifizieren. Die Mischung der PCR-Produkte gleicher Länge wurden dann wiederum auf einem Gradientengel nach den Vorgaben von Diéz et al. aufgetragen.

Die Abb. 3.22 zeigt ein Gradientengel, auf welchem PCR-Produkte von DNA, die während des Versuches aus dem Mesokosmos I isoliert wurde, aufgetragen wurden. Es wurde mangels adäquater PCR-Produkte von einzelnen Eukaryoten wiederum der bereits oben beschriebene Marker verwendet. In diesem Fall dient der Marker lediglich wie ein Längenstandard in Agarosegelen der Kontrolle des Gels, insbesondere der Gleichmässigkeit des Gradienten.

Wie schon im Falle der Gele in Abb. 3.20a und b ist lediglich eine teilweise Sequenzierung der extrahierten Banden gelungen. Dabei traten dieselben technischen Probleme auf. Zu diesen kamen noch Ungenauigkeiten bei der Zuordnung der Banden: Da extrahierte Banden teilweise durch DNA anderer Banden kontaminiert ist, wird in der Regel eine Bande mit gleicher Höhe mehrfach extrahiert und wenigsten ein weiteres Mal auf einem DGGE-Gel auf ihre Reinheit überprüft. Im Folgenden waren jedoch die Zuordnungen einiger Banden nicht eindeutig, so dass zwei an völlig unterschiedlichen Positionen des Gels liegende Banden gleiche DNA-Sequenzen aufwiesen. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle 3.III aufgeführt.

Wie in Abb. 3.22 erkennbar liegen im Gel drei Bereiche vor, in denen Konzentrationen von dicht beieinander liegenden Banden vorliegen: unmittelbar unter dem oberen Ende des Gels über den gesamten Versuchsverlauf fünf bis zehn Banden auf, auf der Höhe des Markers I befindet sich eine weitere Anzahl von vier bis fünf Banden, die sporadisch im Gel auftritt. Unterhalb des Markers treten letztendlich zwei Banden in den Gelen auf.

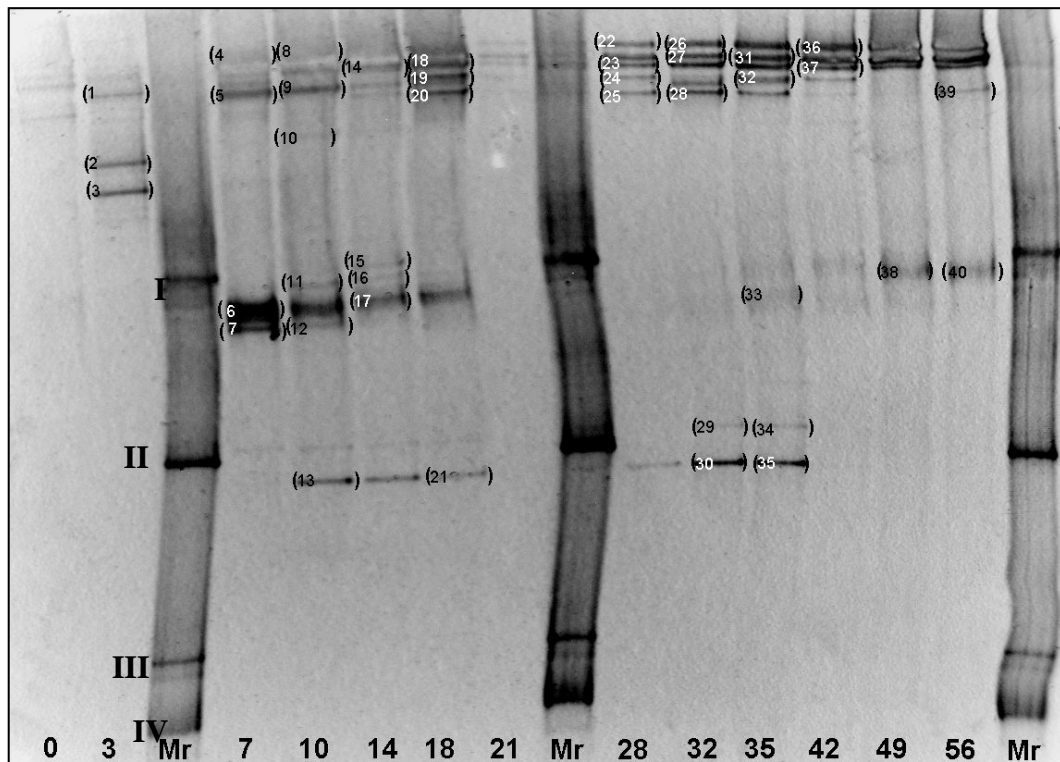


Abb. 3.22: Denaturierendes Gradientengel der DNA-Proben aus der Flüssigkeit des Mesokosmos I unter Verwendung der Primer EUK 1a und EUK 516r-GC nach Diéz et al.. Aufgetragen sind Proben der Versuchstage 0 bis 56. Der Versuchstag der jeweiligen Probe ist am oberen Ende des Gels aufgetragen. Die Beschriftung Mr steht für den oben beschriebenen Marker. Die im Marker enthaltenen Banden 70 (I), 73 (II), 80 (III) und 81(IV) sind gesondert in schwarzen römischen Zahlen aufgeführt. Die in runden Klammern markierten Banden wurden extrahiert und sequenziert. Diese Banden werden weiter unten unter den entsprechenden Nummern aufgeführt. Der Gradient des Gels reichte von 15 – 55% Formamid/Harnstoff.

Bei genauer Betrachtung der Abb. 3.22 ist ebenso wie in den Abbildungen 3.20 a – c eine starke Veränderung der Bandenprofile vom Tag 0 bis zum Versuchstag 7 zu erkennen. Innerhalb der ersten Tage konnte anhand der Banden E 2 und 3 die Abundanz eines ungewöhnlichen Eukaryoten gezeigt werden: Die DNA-Sequenz beider Banden deutet auf die Anwesenheit eines Manteltieres (*Tunicata*) hin. Dies könnte durch die Anwesenheit von Zoosporen oder Larven dieses Organismus in diesem Zeitraum hin. Zwischen den Versuchstagen 7 und 14 stechen hingegen vor allem die Banden E 5 (9), E 6 und E 7 hervor. Die aus der Bande E 5 extrahierte DNA hatte dabei eine hohe Ähnlichkeit zu *Cafeteria roenbergensis*, einem Flagellaten, der natürlicherweise in Meerwasser auftritt. Die DNA in der Bande E 7 zeigte hingegen eine hohe Ähnlichkeit zur 18S rDNA von *Parauremonema longum*, einem Ciliaten der zu den Scuticociliaten, genauer gesagt den *Philasteridae* zugeordnet wird. Dieser Organismus ist in Abbildung 3.18b vom Versuchstag 7 deutlich zu erkennen.

Seine morphologischen Eigenarten sind die elliptische oder Kegelform, ein vollständiger Besatz mit Cillien und die große Vakuole. Zwei weitere Exemplare sind in Abb. 3.18e teilweise zu erkennen. Die Banden E 5 bis 7 verlieren jedoch bereits in den folgenden Profilen an Intensität, beide Spezies wurden durch andere Protozoen abgelöst. Hier könnte ein Zusammenhang zum massiven Auftreten von Amöben bestehen. Parallel hierzu treten die intensiven Banden E13 (21) sowie E 18 bis 20 sowie E 23 bis 28 auf.

Anhand der letztgenannten Banden konnten einer Zahl von Flagellaten identifiziert werden, wobei die DNA in Bande E 19 dem Flagellaten *Mallomonas annulata* und jene in E 20 dem Dinoflagellaten *Cryptocodinium sp.* zugeordnet werden konnte.

Die aus E 13 extrahierte DNA weist im Gegensatz dazu eine hohe Ähnlichkeit zur 18S rDNA von *Euplotes rariseta* auf, einem weiteren Ciliaten, der sich durch ein großes gebogenes und mit vielen Cilien besetztes Peristom (Zellmund) sowie eine große Zahl dorsaler und ventraler Cilien, die in Bündeln zu so genannten Cirren zusammengefasst sind, auszeichnet. *Euplotes* ist ein Bewohner von Ansammlungen von Biomasse, zum Beispiel Algenmaterial und marinem Schnee, auf dessen Oberfläche er mit seinen Cirren hinweg zu laufen scheint. Die Abbildungen 3.18f bis i zeigen eine Spezies von *Euplotes* die in dem Mesokosmos I, jedoch zwischen dem Versuchstag 32 und 40 beobachtet wurde. In der Tat ist die Bande 13 jedoch von Tag 10 bis 35 zu erkennen.

Bis zum Versuchsende bleiben die Banden E 22, E 23 und E 27 sichtbar, was darauf schliessen lässt, dass auch diese Organismen eine wichtige Rolle in den Mesokosmen spielen. Von besonderem Interesse sind dabei E 22 und 23, die auf die Anwesenheit weiterer Scuticociliaten hinweisen: die DNA in E 22 hat eine hohe Ähnlichkeit zur 18S rDNA von *Uronema marinum*, jene von E 23 eine etwas geringere Ähnlichkeit zu *Uronema elegans*. Dies impliziert, dass eine Art von Scuticociliaten – *Parauronema sp.* (E 6) - im Mesokosmos durch eine andere - *Uronema sp.* (E 22/23) - abgelöst wird, also eine ökologische Nische für die Scuticociliaten über den gesamten Versuchsablauf besteht. Es wurden im Mesokosmos I tatsächlich zwei morphologisch unterschiedliche Arten dieser Protozoen mikroskopisch beobachtet. Erstaunlicherweise lässt die Intensität aller Banden, die unterhalb des Markers I liegen an den Versuchstagen 21 und 28 nach, teilweise sind die Banden sogar nicht mehr sichtbar. Dies korreliert mit einer geringen Zellzahl zwischen den Versuchstagen 17 und 24, wie in der Abbildung 3.18 a deutlich zu erkennen ist.

Nach der Verdünnung der Mesokosmenflüssigkeit am Versuchstag 28 treten neben den bereits genannten Banden E 22 bis 28 auch die Banden E 33 bis 35 auf. Dabei waren E 34 und 35 bereits vor der Verdünnung des Mesokosmos zu erkennen. Die Organismen, auf die diese Banden hinweisen scheinen also eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der bakteriellen Zellzahl zu spielen. Ein weiteres Indiz hierfür ist das Fehlen der Banden ab dem Versuchstag 35. In der Abb. 3.15 ist zu diesem Zeitpunkt ein Absinken der bakteriellen Zellzahl, in den Abb. 3.20 a – c sowohl auf Ebene der DNA als auch der RNA eine Verschiebung der Bandenmuster, vermutlich aufgrund der geringer werdenden Konzentration emulgierten Öls im Mesokosmos I, zu erkennen. Die Sequenzierung der aus diesen Banden extrahierten DNA ergab dabei ein von den bisherigen Ergebnissen abweichendes Resultat: So wurden die Banden E 30 und 35 *Mallomonas sp.* und die Bande 29 *Uronema marinum* zugeordnet. Anhand des GC-Gehaltes und des Vergleiches mit anderen Banden ist dies nicht möglich und mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Resultat einer Kontamination der Banden. Die Banden 30 und 35 liegen in derselben Position im Gel wie die Bande 13 (21), die *Euplotes rariseta* zugeordnet wurde. Dies wird unterstützt durch das Ergebnis der Sequenzierung der DNA in Bande 34, die eine hohe Ähnlichkeit zu einer zweiten Spezies von *Euplotes* – *E. minuta* – zeigte. Wie auch im Falle der Scuticociliaten wurden tatsächlich mehrere morphologisch unterschiedliche Arten von *Euplotes sp.* während des ganzen Versuches beobachtet, was letztlich durch die hier gezeigten Ergebnisse bestätigt wird.

Ab dem Versuchstag 35 kommt es möglicherweise infolge der Veränderungen der mikrobiellen zu einer parallelen Verschiebung der eukaryotischen Gemeinschaft, in der die Banden E 31, 36 und 37 im oberen Teil des Gels sowie die Banden 38 und 39 im unteren Teil des Gels hervortreten. Keine dieser Banden konnte jedoch sequenziert werden. Erstaunlicherweise konnte in den Bandenprofilen keine Bande identifiziert werden, die den im Mesokosmos beobachteten Amöben zuzuordnen ist. Möglicherweise wurde die rDNA der Amöben aufgrund der verwendeten Primer nicht amplifiziert.

Tab. 3.III: Vergleich der DNA-Sequenzen der aus dem Gel in Abb. 3.22 extrahierten Banden mit DNA-Sequenzen aus der Datenbank GenBank mittels BlastN. Angegeben sind die Nummer der in Abb. 3.22 aufgeführten Sequenzen der DNA aus den Banden sowie die ermittelte DNA-Sequenz (GenBank Accession Nr.) mit der höchsten prozentualen Ähnlichkeit. Zusätzlich angegeben sind die zu jeder Sequenz ermittelte Art sowie deren phylogenetische Zuordnung. Alle ausgeschnittenen Banden wurden mit dem forward- und dem reverse primer sequenziert und ein sequence assembly (Überlagerung und Korrektur der beiden Sequenzen) mittels der CAP-Subroutine des Programms Bioedit durchgeführt.

Bande Nr.	Spezies (größte Ähnlichkeit) Accession Nr. (GenBank)	Phylogenetische Gruppe	%
E2	<i>Ciona intestinalis</i> AK174068	<i>Metazoa; Chordata; Urochordata; Ascidiacea; Enterogona; Phlebobranchia; Cionidae</i>	92
E3	<i>Ciona intestinalis</i> AK174068	<i>Metazoa; Chordata; Urochordata; Ascidiacea; Enterogona; Phlebobranchia; Cionidae</i>	98
E5	<i>Cafeteria roenbergensis</i> L27633	<i>Stramenopiles; Bicosoecida; Cafeteriaceae</i>	94
E6	<i>Paraonema longum</i> AY212807	<i>Alveolata; Ciliophora; Intramacronucleata; Oligo-hymenophorea; Scuticociliatia; Philasterida; Philasteridae</i>	95
E11	<i>Petalomonas cantuscygni</i> AF386635	<i>Euglenozoa; Euglenida; Sphenomonadales; Sphenomonadidae</i>	95
E19	<i>Mallomonas annulata</i> U73230	<i>Stramenopiles; Synurophyceae; Synurales; Mallomonadaceae</i>	95
E20	<i>Cryptocodinium sp.</i> CAAE-CL2 DQ322643	<i>Alveolata; Dinophyceae; Gonyaulacales; Cryptocodiniaceae</i>	96
E21	<i>Euplotes rariseta</i> AJ305248	<i>Alveolata; Ciliophora; Intramacronucleata; Spirotrichea; Hypotrichia; Euplotida; Euplotidae</i>	90
E22	<i>Uronema marinum</i> AY551905	<i>Alveolata; Ciliophora; Intramacronucleata; Oligo-hymenophorea; Scuticociliatia; Philasterida; Uronematidae</i>	98
E23	<i>Uronema elegans</i> AY103190	<i>Alveolata; Ciliophora; Intramacronucleata; Oligo-hymenophorea; Scuticociliatia; Philasterida; Uronematidae</i>	84
E24	<i>Cryptocodinium sp.</i> CAAE-CL2 DQ322643	<i>Alveolata; Dinophyceae; Gonyaulacales; Cryptocodiniaceae</i>	98
E25	<i>Euplotes rariseta</i> AJ305248	<i>Alveolata; Ciliophora; Intramacronucleata; Spirotrichea; Hypotrichia; Euplotida; Euplotidae</i>	93
E26	<i>Cryptocodinium sp.</i> CAAE-CL2 DQ322643	<i>Alveolata; Dinophyceae; Gonyaulacales; Cryptocodiniaceae</i>	93
E29	<i>Uronema marinum</i> AY551905	<i>Alveolata; Ciliophora; Intramacronucleata; Oligo-hymenophorea; Scuticociliatia; Philasterida; Uronematidae</i>	83
E30	<i>Mallomonas annulata</i> U73230	<i>Stramenopiles; Synurophyceae; Synurales; Mallomonadaceae</i>	95
E33	<i>Petalomonas cantuscygni</i> AF386635	<i>Euglenozoa; Euglenida; Sphenomonadales; Sphenomonadidae</i>	96
E34	<i>Euplotes minuta</i> AJ310490	<i>Alveolata; Ciliophora; Intramacronucleata; Spirotrichea; Hypotrichia; Euplotida; Euplotidae</i>	88
E35	<i>Mallomonas annulata</i> U73230	<i>Stramenopiles; Synurophyceae; Synurales; Mallomonadaceae</i>	85

Die oben gezeigten Ergebnisse weisen auf eine ausserordentlich wichtige Rolle der Scuticociliaten und der Gattung *Euplotes* in den eukaryotischen Gemeinschaften der Mesokosmen hin. Es wurde bereits lichtmikroskopisch nachgewiesen, dass diese Eukaryoten aktiv die Biofilme der ölabbauenden Mikroorganismen aufsuchen und diese abweiden. Sie scheinen daher zusammen mit den molekularbiologisch nicht nachgewiesenen Amöben für das „Grazing“ – den Protozoenfrass der Biofilme und der Kontrolle der Biomasse - verantwortlich zu sein. Abb. 3.23 a und b zeigen die Einbindung der in den DGGE-Gelen nachgewiesenen 18S rDNA-Sequenzen in die einzelnen phylogenetischen Gruppen. Dabei wurden mittels des Programms MEGA 4.0 phylogentische Bäume der Familie der *Euplotidaceae* und die Unterklasse der *Scuticociliatia* angefertigt.

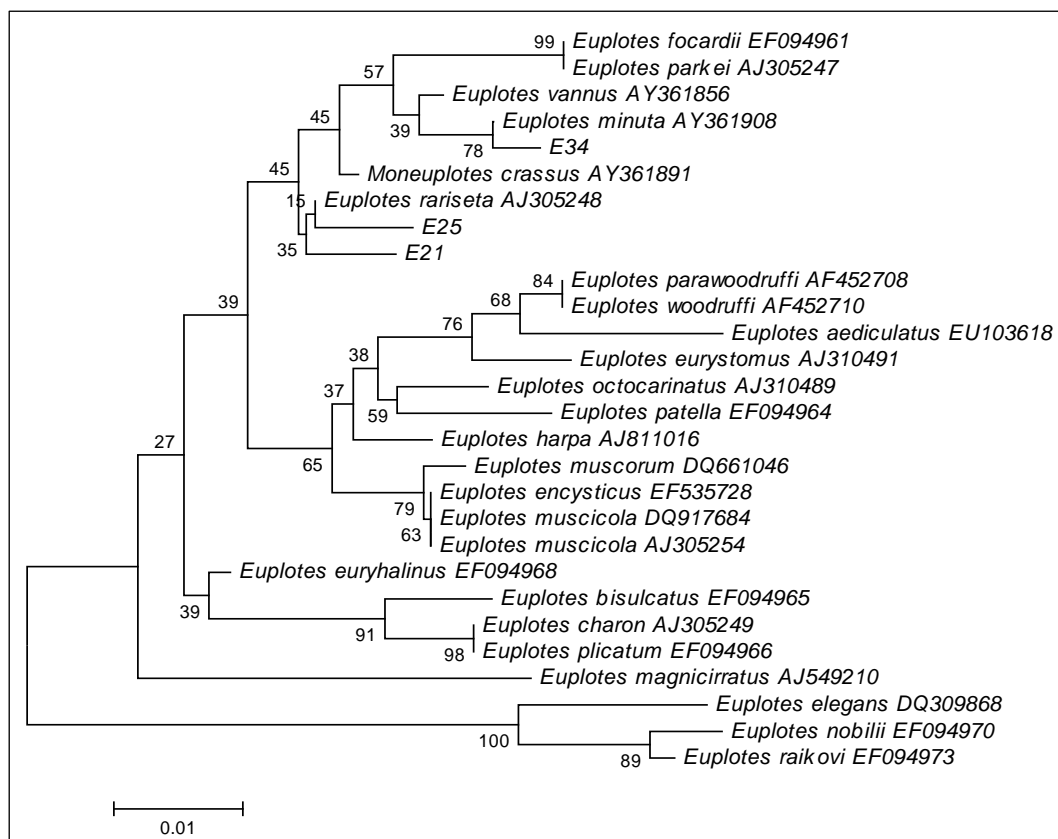


Abb. 3.23a: phylogenetischer Baum der Mitglieder der *Euplotidae* unter den aus dem Gel in Abb. 3.22 extrahierten Banden. Referenzsequenzen wurden der Gendatenbank Nucleotide, bzw. CoreNucleotide entnommen. Es handelt sich dabei um bereits publizierte Sequenzen, deren Accession Nr. der jeweiligen Sequenz beigegefügt wurde. Für die Konstruktion der phylogenetischen Bäume wurde das Programm Mega 4.0 verwendet. Es wurde ein Bootstrapping mit 1000 Datensätzen durchgeführt, gefolgt von einer Neighbour-joining-Analyse unter Verwendung des Kimura-2-Parameters.

Die phylogenetische Analyse der DNA-Sequenzen der Banden E 21, 25 und 34 bestätigen die Ergebnisse des Abgleichs mit der Datenbank GenBank durch die BlastN-Subroutine. Die Banden E 21 und 25 zeigen eine hohe Ähnlichkeit zueinander und zu *Euplotes rariseta*. Es liegt dennoch eine Abweichung vor, die darauf hinweist, dass es sich um eine andere Art handelt. E 21 und 25 haben neben *E. rariseta* keine Ähnlichkeiten zu anderen Mitgliedern dieser Familie.

Im Falle der Bande E 34 liegt – ebenfalls wie durch den Abgleich mit der Datenbank – eine hohe Ähnlichkeit zu *E. minuta* und eine etwas geringere zu *E. vannus* vor.

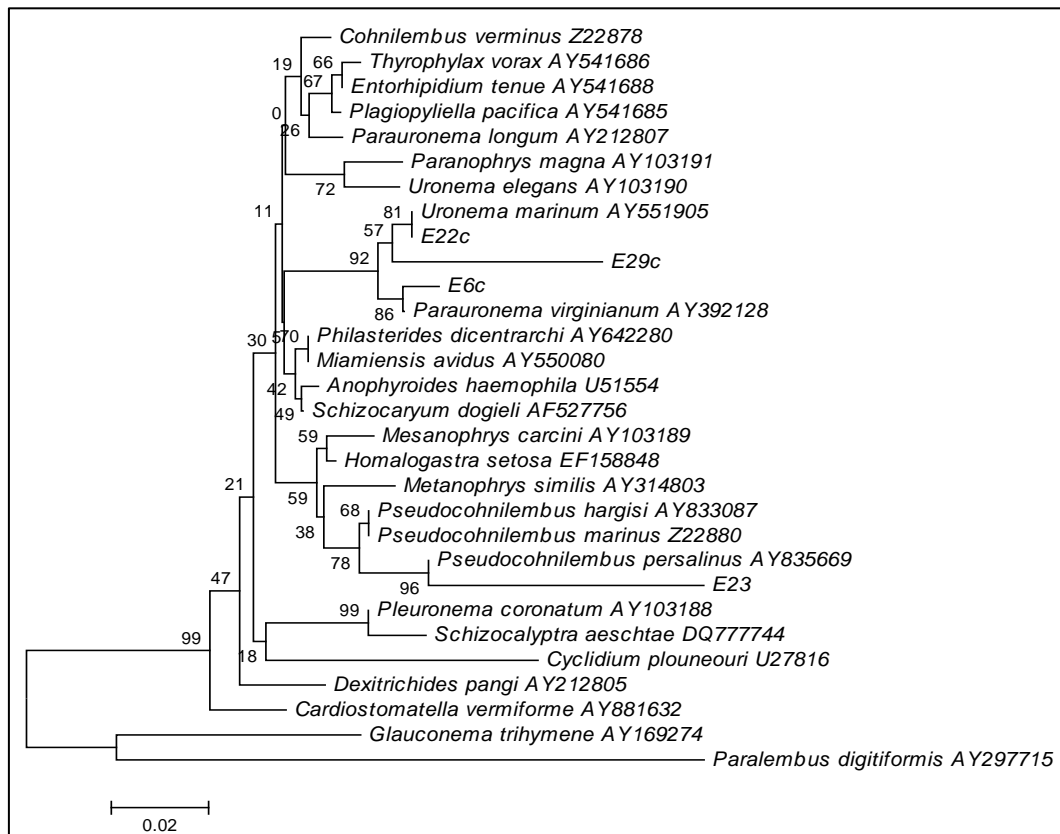


Abb. 3.23b: phylogenetischer Baum der Mitglieder der *Scuticociliatia* unter den aus dem Gel in Abb. 3.22 extrahierten Banden. Referenzsequenzen wurden der Gendatenbank Nucleotide, bzw. CoreNucleotide entnommen. Es handelt sich dabei um bereits publizierte Sequenzen, deren Accession Nr. der jeweiligen Sequenz beigefügt wurde. Für die Konstruktion der phylogenetischen Bäume wurde das Programm Mega 4.0 verwendet. Es wurde ein Bootstrapping mit 1000 Datensätzen durchgeführt, gefolgt von einer Neighbour-joining-Analyse unter Verwendung des Kimura-2-Parameters.

Abb. 3.23b zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Unterklasse der *Scuticociliatia*. Wie bereits gezeigt wurden diese Wimperntierchen in großer Zahl an und in der Umgebung der ölabbauenden Biofilme über den gesamten Versuchsablauf beobachtet. Von den vier aus dem DGGE-Gel in Abb. 3.22 extrahierten Sequenzen zeigten zwei eine Verwandtschaft zu *Uronema marinum* und je eine zu *Paraureonema virginianum* sowie *Pseudocohnilembus persalinum*. Es liegen relativ hohe phylogenetische Entfernungen bzw. Astlängen auf dem phylogenetischen Baum vor, was vermutlich auf eine mässige Qualität der Sequenzierungsreaktion zurückzuführen ist.

Dennoch bestätigen sowohl die Ergebnisse von Abb. 3.23a als auch 3.23b die mikroskopischen Beobachtungen. Es wurden über den gesamten Versuchsablauf drei morphologisch verschiedene Arten von *Euplotes* sp. sowie zwei morphologisch unterschiedliche Arten von Scuticociliaten entdeckt. Die verschiedenen Arten sind in den Abbildungen 4.3 aufgeführt und werden mit Abbildungen der entsprechenden Gattungen bzw. Arten, die im Internet verfügbar sind verglichen.

Leider konnten die mikroskopisch beobachteten Amöben nicht molekularbiologisch nachgewiesen werden. Dies war auch im Fall einer nicht näher definierten Art von Sontentierchen (*Heliozoon*) der Fall. In beiden Fällen ist eine Identifikation anhand der Morphologie nicht möglich. Ein gegensätzliches Beispiel lieferte die Diversität der Flagellaten: hierbei wurden nur drei morphologisch unterschiedliche Typen entdeckt, die molekularbiologische Analyse zeigte jedoch eine Vielzahl an Arten auf, u.a. auch Dinoflagellaten, die in den Mikrokosmen mikroskopisch nicht beobachtet wurden.

3.23 Predationsmikrokosmen - Untersuchung der Auswirkungen von Grazing durch Protozoen auf ölabbauende Bakterien

Allgemeine Beobachtungen:

Wie bereits erwähnt sollte ausgehend von den Erfahrungen der Mesokosmenstudie eine weitere Versuchsreihe ermitteln, inwieweit ein quantitativer Effekt durch das Grazing von Biomasse ölabbauender Bakterien auftritt und ob dieser positive bzw. negative Auswirkungen auf den Prozess des Schadstoffabbaus hat. Hierzu wurden Protozoen in verschiedenen Ansätzen selektiv mittels Cycloheximid eliminiert, wobei diese Zugabe des Giftes in einem Mikrokosmos sofort, in einem weiteren drei Wochen nach Versuchsbeginn erfolgte und in einer Kontrolle ausgesetzt wurde. Als Messgrößen wurden die Zellzahl, die Respiration und die chemischen Veränderungen der Ölrückstände herangezogen.

Parallel hierzu wurde eine neuartige Form von Ölbindemittel getestet. Neben dem bereits für die oben präsentierten Ölbindemittel X-Oil aus Textilfasern wurde das Material SuperM (Hellmann-Tech, Lehrte) aus Polypropylenfasern angewendet.

Beide Ölbindemittel zeigten dabei sehr unterschiedliche Eigenschaften: Für die Versuche wurden jeweils Mengen von 5 g eingesetzt; das X-Oil bildete nach Zugabe von Öl im Mikrokosmos jeweils eine Kugelform mit einem Durchmesser von circa 4 – 5 cm aus. Es zeigte eine hohe Affinität zum Öl, jedoch sanken wie im Falle der oben erwähnten Mikrokosmenstudie die Ölbindemittelaggregate innerhalb der ersten beiden Wochen zum Boden der Mikrokosmen ab. SuperM hingegen zeigte eine extrem hohe Affinität zum eingesetzten Bunker C-Schweröl. Darüber hinaus zeigte sich, dass 5 g SuperM ein Volumen von etwa 150 – 200 ml einnahmen. Das sehr faserige Ölbindemittel befand sich bis zum Ende des Versuches an der Oberfläche der Mikrokosmen, jedoch gelangte dadurch das gebundene Öl nicht vollständig in Kontakt mit der Mikrokosmenflüssigkeit.

Trotz der Zugabe einer ausreichenden Menge an Langzeitdünger, einer Versuchstemperatur von 18°C und Durchmischung auf einem Schüttler ist es in allen sechs Mikrokosmen während des Versuches nicht zu einer extrem starken Emulsionsbildung, durch die die Predationsmikrokosmen schwarz gefärbt wurden, gekommen, wie dies im Falle der ersten Mikrokosmenstudie der Fall war. Die Gründe hierfür könnten eine nicht ausreichende Versorgung mit Sauerstoff oder Nährstoffen bzw. ein zu geringer Titer an ölabbauenden Mikroorganismen sein, zumal in diesem Falle keine Biomasse von *A. borkumensis* beigefügt wurde. Eine weitere potenzielle Erklärung für die geringe Emulsionsbildung ist in der Bindung des Öls an das Ölbindemittel zu suchen. Sowohl im Falle der Mikrokosmen- als auch der Mesokosmenstudie wurde ein Teil des Öls nicht gebunden sondern lag frei an der Wasseroberfläche vor. In diesem Fall wurde durch die große Menge an Ölbindemittel das Bunker C – Schweröl vollständig gebunden. Anhand der Abbildung 3.2c, die während der ersten Mikrokosmenstudie entstanden ist, ist zu erkennen, dass das an X-Oil gebundene Öl an der Oberfläche der Textilfasern in Biofilme eingehüllt wurde und nicht vom Ölbindemittel abgelöst wurde.

Im Verlaufe des Versuches konnte in den Mikrokosmen, denen X-Oil zugegeben wurde, eine leichte Emulsionsbildung nach 21 Tagen beobachtet werden. Dabei lagen sehr kleine Aggregate von Biofilmen in einer relativ geringen Konzentration im Vergleich zu den dichten Emulsionen der ersten Mikrokosmenstudie vor. Abb. 3.24 zeigt exemplarisch je einen mit X-Oil und einen mit SuperM behandelten Mikrokosmos am Versuchstag 21.

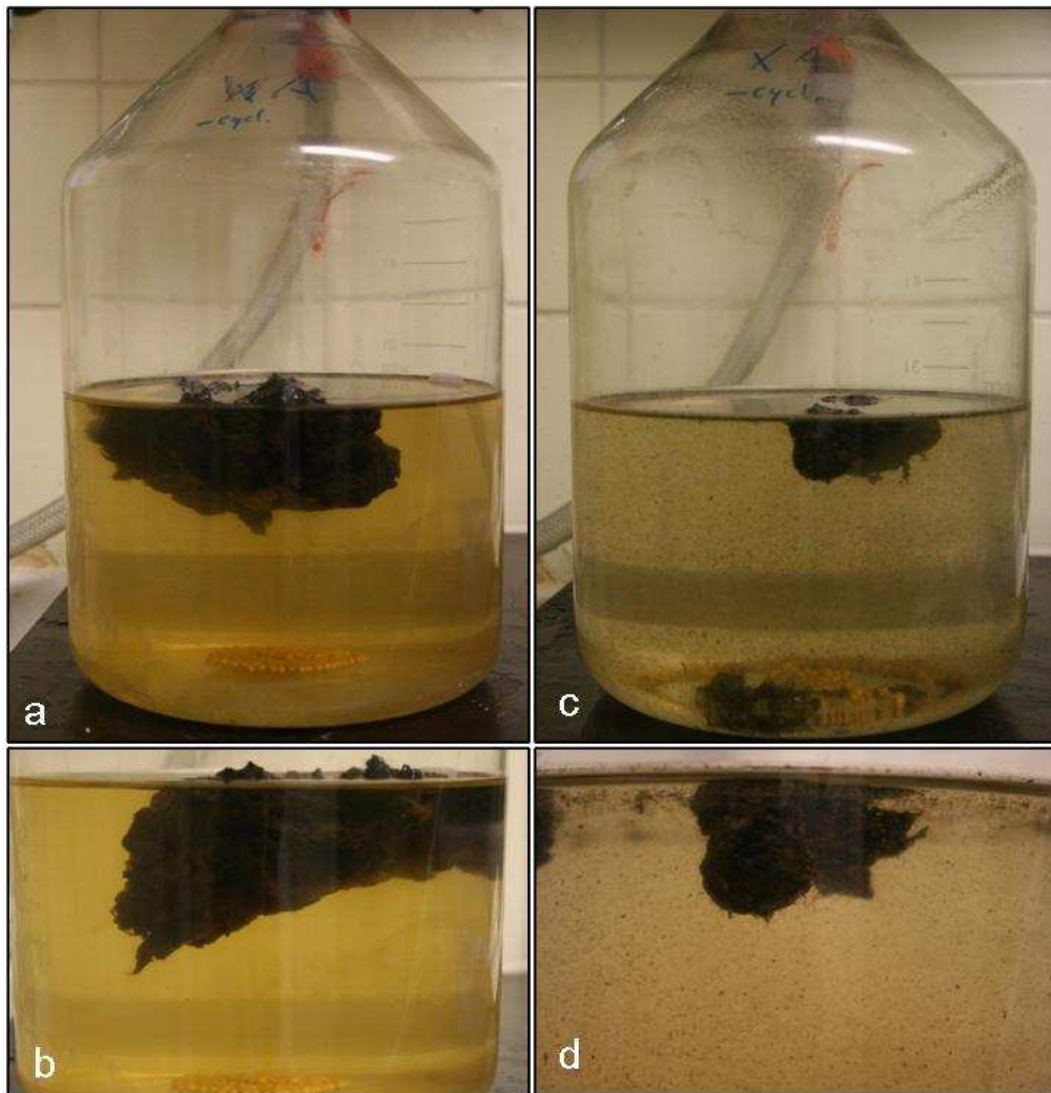


Abb. 3.24 a – d: Emulsionsbildung in den Mikrokosmen WA und XA; in beiden Mikrokosmen wurde kein Cycloheximid zugegeben. Mikrokosmos WA (3.24 a und b) enthält das Ölbindemittel SuperM, während XA (3.24 c und d) mit X-Oil versetzt wurde. Die Abbildungen 3.24 b und d zeigen Ausschnittsvergrößerungen der beiden Mikrokosmen, insbesondere des jeweiligen Ölbindemittels

In der Abb. 3.24 sind besonders deutlich die Unterschiede des Volumens, welches die jeweils 5g des Bindemittels einnehmen, zu sehen. Dieses Volumen im Verhältnis zur Masse ist für den technischen Einsatz des Ölbindemittels von größter Wichtigkeit, da dieser Faktor nicht nur die Aufnahmefähigkeit sondern auch die Schwimmfähigkeit des Bindemittels massgeblich beeinflusst.

Desweiteren ist die Emulsionsbildung im Mikrokosmos XA zu erkennen; während die Abbildungen 3.24 a und b im Falle des Mikrokosmos WA eine transparente Mikrokosmenflüssigkeit zeigen, ist im Mikrokosmos deutlich eine hohe Anzahl kleiner, schwarzer Aggregate zu erkennen. Wie bereits im Falle der oben beschriebenen Mikrokosmenstudie handelt es sich hierbei um Biofilme, die Tröpfchen des Bunker C – Schweröls einschliessen. Die Emulsionsbildung lediglich in allen mit X-Oil behandelten Mikrokosmen zu beobachten.

3.24 Predationsmikrokosmen - Mikroskopische Bestimmung der Zellzahl

Analog zur Mesokosmenstudie wurde erneut die bakterielle Zellzahl in den Mesokosmen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Im Falle der Mesokosmen konnte mehrfach eine Senkung oder Stabilisierung der mikrobiellen Zellzahlen bei gleichzeitiger Senkung der Respiration festgestellt werden. In den meisten Fällen korrelierte dies mit einem Wachstum von Protozoen. In diesem Experiment wurden die Protozoen in einigen Ansätzen durch spezifische Giftstoffe eliminiert; somit sollten Unterschiede in bakterieller Zellzahl zwischen unbehandelten und mit Cycloheximid versetzten Mikrokosmen sichtbar sein. Die Ergebnisse sind in den Abb. 3.25 a und b aufgeführt.

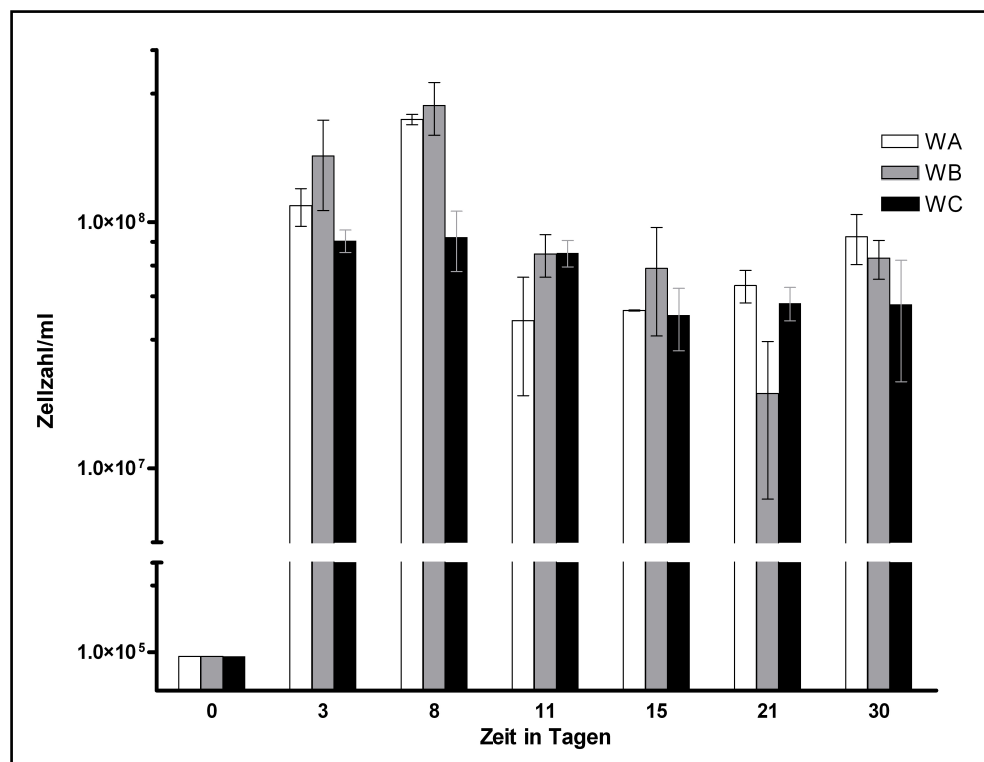


Abb. 3.25a: Vergleich der Zellzahlen pro Liter Mesokosmenflüssigkeit in den Mikrokosmen WA, WB und WC über den gesamten Versuchsablauf. Alle aufgeführten Mikrokosmen wurden mit dem Ölbindemittel SuperM versetzt. Mikrokosmos WA wurde nicht, Mikrokosmos WB zu Versuchsbeginn und Mikrokosmos WC nach 21 Tagen mit Cycloheximid behandelt. Für jeden Messzeitpunkt wurden drei Proben entnommen und die Zellzahlen mittels einer Neubauerkammer gezählt. Die im Diagramm aufgetragenen Werte repräsentieren die Mittelwerte aus je drei parallelen Messungen pro Mesokosmos und Messzeitpunkt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die logarithmische Skala der Y-Achse wurde aufgrund des großen Unterschiedes zwischen der einleitenden und den fortgeführten Messungen unterbrochen und eine Lücke eingefügt, die sich zwischen 5×10^5 und 5×10^6 Zellen erstreckt. Das Messergebnis für den Versuchstag 0 bezieht sich auf eine Probe des Meerwassers, welches als Grundlage für die Mikrokosmen diente

Wie aus Abb. 3.25a hervorgeht, gibt es in den Mikrokosmen WA bis WC ein sehr starkes Wachstum innerhalb der ersten drei Tage. Die Zellzahl steigt dabei von etwa 80.000 Zellen pro ml, einem für Meerwasser relativ hohen Wert, an auf mehr als 10^8 Zellen pro ml Mesokosmenflüssigkeit. Sowohl in Mikrokosmos WA als auch WB wird bis zum Tag 8 eine derartig hohe Zellzahl beibehalten.

Im Mikrokosmos WA sinkt die Zellzahl darauf drastisch ab auf 4×10^7 Zellen pro ml, steigt dann aber bis zum Versuchsende leicht an. Die Zellzahlen im Ansatz WB gehen bis zum Versuchstag 21 sehr viel langsamer zurück, erreichen einen Wert von circa $1,5 \times 10^7$ Zellen, steigen darauf aber noch einmal an. Mikrokosmos WC, der erst nach 21 Tagen mit Cycloheximid behandelt wurde, zeigte nach dem anfänglichen Wachstum eine stetig zwischen 6 und 2×10^7 Zellen pro ml schwankende Konzentration von Mikroorganismen. Die Zellzahlen der Mikrokosmen WA bis WC zeigen hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen. Betrachtet man die Standardabweichungen der einzelnen Messwerte, so kann man festhalten, dass die Zellzahlen in der Regel vergleichbar hoch sind. In schwaches Indiz auf Unterschiede durch Grazing ist ab dem Tag 8 bei den Ansätzen WA und WB zu erkennen: Die Zellzahl fällt im Ansatz WA rapide ab während sie im Ansatz WB bis zum Tag 15 etwa konstant bleibt.

Da die Mikrokosmen WA und WC bis zum Tag 21 nicht mit Cycloheximid versetzt wurden, hätte zwischen den Zellzahlen beider Ansätze kein größerer Unterschied bestehen dürfen; tatsächlich aber bleiben die Zellzahlen im Ansatz WC konstant, während es im Mikrokosmos WA relativ große Schwankungen gibt.

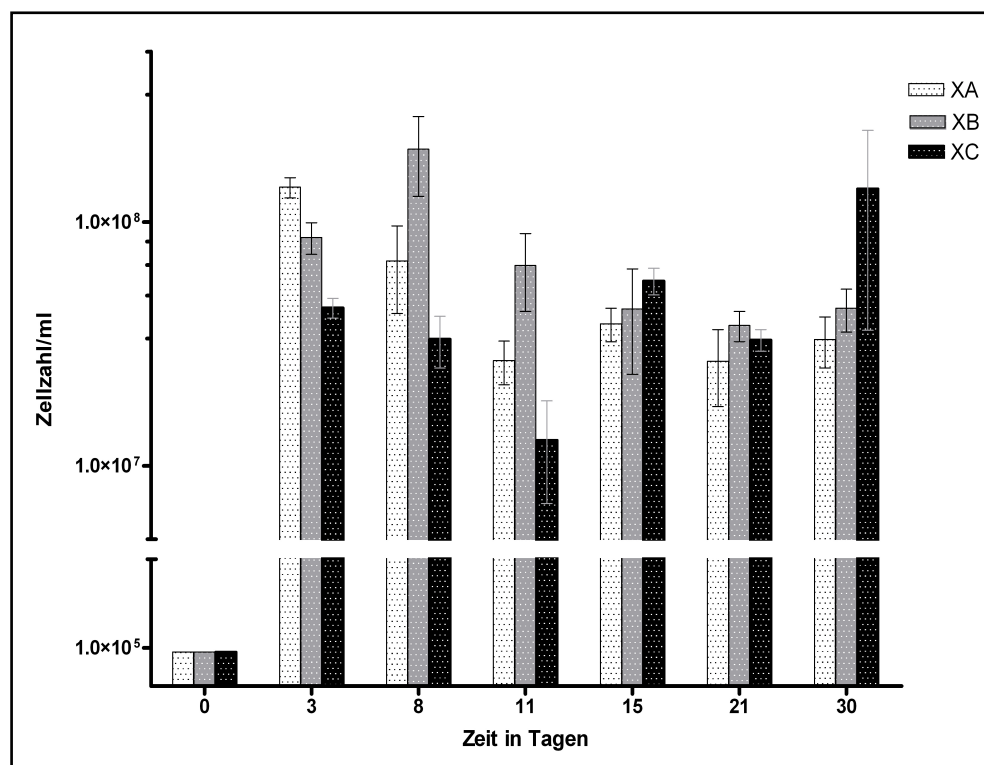


Abb. 3.25b: Vergleich der Zellzahlen pro Liter Mikrokosmenflüssigkeit in den Mikrokosmen XA, XB und XC über den gesamten Versuchsablauf. Alle aufgeführten Mikrokosmen wurden mit dem Ölbindemittel X-Oil versetzt. Mikrokosmos XA wurde nicht, Mikrokosmos XB zu Versuchsbeginn und Mikrokosmos XC nach 21 Tagen mit Cycloheximid behandelt. Für jeden Messzeitpunkt wurden drei Proben entnommen und die Zellzahlen mittels einer Neubauerkammer gezählt. Die im Diagramm aufgetragenen Werte repräsentieren die Mittelwerte aus je drei parallelen Messungen pro Mesokosmos und Messzeitpunkt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die logarithmische Skala der Y-Achse wurde aufgrund des großen Unterschiedes zwischen der einleitenden und den fortgeführten Messungen unterbrochen und eine Lücke eingefügt, die sich zwischen 5×10^5 und 5×10^6 Zellen erstreckt. Das Messergebnis für den Versuchstag 0 bezieht sich auf eine Probe des Meerwassers, welches als Grundlage für die Mikrokosmen diente.

Wie im Fall der Mikrokosmen WA bis WC ist anhand der Abb. 3.25b ein starkes Wachstum der Bakterien innerhalb der ersten drei Tage bis hin zu Zellzahlen von 6×10^7 bis 1×10^8 zu erkennen. Im Gegensatz zu den mit SuperM versetzten sind in diesen Ansätzen Unterschiede zwischen den einzelnen Mikrokosmen zu erkennen: So sinken die Zellzahlen in den Ansätzen XA und XC nach anfänglichem Wachstum bis zum Tag 11 hin ab auf Konzentrationen von 1×10^7 Zellen pro ml. Im Falle des Mikrokosmos XA bleiben die Zellzahlen bis zum Versuchsende relativ konstant, während im Mikrokosmos XC ein stetiges Ansteigen derselben festzustellen ist. Zwischen dem Tag 21 und dem Tag 30 ist im Ansatz XC eine Steigerung von 500% von etwa 2×10^7 auf 10^8 Zellen zu beobachten. Dies könnte auf die Zugabe des Cycloheximids am Versuchstag 21 zurückzuführen sein, in dessen Folge die Protozoen in diesem Ansatz eliminiert wurden und das bakterielle Wachstum nicht mehr bremsen konnten. Im Gegensatz zu den übrigen Mikrokosmen zeigt der Ansatz XB ein abweichendes Verhalten: Nach dem anfänglichen Wachstum sinkt die Zellzahl weniger stark ab als in XA und XC, sie stabilisiert sich ab dem Tag 15 bei circa 3×10^7 Zellen/ml. Zwischen den Versuchstagen 3 und 21 ist somit eine deutliche Diskrepanz zwischen Ansatz XB und den Ansätzen XA und XC zu erkennen. Die Effekte der Cycloheximidzugabe sind im Falle der mit X-Oil behandelten Versuchsansätze sehr viel deutlicher zu erkennen als dies in den Ansätzen WA bis WC der Fall war. Wie bereits in der Mesokosmenstudie kam es in diesen nach einer starken Vermehrung der Bakterien zu einem schnellen Rückgang der Zellzahl, der möglicherweise auf Protozoen zurückzuführen ist. Im Mikrokosmos XB, der bereits zu Beginn mit diesem Giftstoff behandelt wurde ist ein solcher Einbruch der Zellzahl nicht zu verzeichnen. Dies deutet an, dass in diesem Ansatz die durch die mikrobiellen Gemeinschaften verwerteten Ressourcen verbraucht wurden und die Biomasse durch das Nahrungsangebot kontrolliert wird. Ein weiterer Effekt durch Cycloheximid ist in Mikrokosmos XC ab dem Tag 21 zu erkennen. In diesem Fall ist im Gegensatz zu den Versuchen XA und XB ab der Zugabe des Giftstoffes eine Zunahme der Zellzahl zu verzeichnen. Im Gegensatz zum Ansatz XB scheinen hier offensichtlich noch Grundlagen für das Wachstum in Form von Nährstoffen vorzuliegen, welche bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgeschöpft wurden.

Die Zellzahlen geben somit ein erstes Indiz, dass die Zugabe von selektiv auf Protozoen wirkenden Giften in der Tat eine Auswirkung auf einen Teil der Mikrokosmen zeigten. Interessanterweise gibt es dabei erhebliche Unterschiede zwischen den mit SuperM und X-Oil versetzten Mikrokosmen. Um diese Ergebnisse zu stützen wurde parallel die Respirationsrate in den Mikrokosmen untersucht.

3.25 Predationsmikrokosmen - Untersuchung der Respirationsrate nach Winkler

Analog zur Mesokosmenstudie wurde auch in diesem Fall nach der oben beschriebenen modifizierten Winklermethode die Respiration in den Mikrokosmen untersucht. Da aber nur eine begrenzte Zahl von Winklerflaschen vorlag, konnten pro Mikrokosmos und Messzeitpunkt nur je drei parallele Messungen am Tag der Probennahme und den drei Folgetagen durchgeführt werden. In der Folge wurden keine hyperbolischen Verbrauchskurven sondern lineare Verläufe der Sauerstoffkonzentrationen ermittelt. Die Respiration wurde daher anhand einer Regressionsgerade ermittelt, wobei der Betrag des Steigungsfaktors proportional zur Respirationsrate war. Dieser Faktor nahm dabei Werte zwischen null und 3,5 an. Die für die Mikrokosmen ermittelten Werte wurden in Beziehung zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten gesetzt und in den Abb. 3.26 a und b gegeneinander aufgetragen.

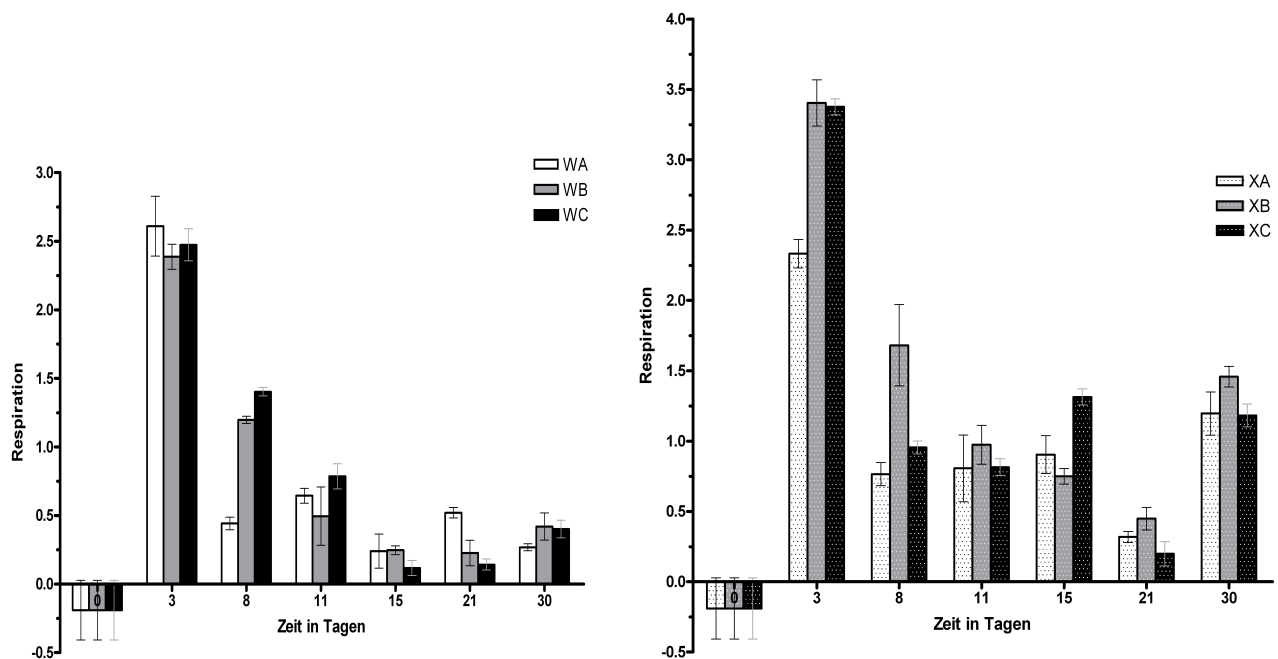


Abb. 3.26 a (l.) und 3.26 b (r.) Respirationsraten in den Mikrokosmen WA, WB und WC (3.26a) sowie XA, XB und XC (3.26b). Gegeneinander aufgetragen sind die dimensionslose Respirationsrate, die dem Betrag des Steigungsfaktors einer Regressionsgerade durch die ermittelten Sauerstoffkonzentrationen in luftdichten Winklerflaschen am Versuchs- sowie an den drei darauf folgenden Tagen entspricht, sowie die einzelnen Zeitpunkte der Probennahmen. Die Angaben entsprechen den Mittelwerten aus je drei Messungen, die Fehlerbalken dem Standardfehler. Das Messergebnis für den Versuchstag 0 bezieht sich auf eine Probe des Meerwassers, welches als Grundlage für die Mikrokosmen diente.

Vergleicht man die Respirationsraten der beiden Mikrokosmensätze WA bis WC sowie XA bis XC, so zeigen sich deutliche Unterschiede: so weisen die mit X-Oil versetzten Mikrokosmen im Allgemeinen eine höhere Respirationsrate auf als jene mit SuperM behandelten. Dabei gibt es in beiden Mikrokosmensätzen ähnliche Verläufe dieser Respirationsraten; parallel zu den Verläufen der Zellzahlen tritt in allen Mikrokosmen ein starker Anstieg der Respiration zwischen dem Versuchsbeginn und dem dritten Versuchstag auf, gefolgt von einem Absinken derselben zwischen dem achten und elften Tag. An den folgenden Tagen schwankt die Respirationsrate oder steigt in einigen Fällen zum Ende des Versuchs hin an.

Analog zu den Ergebnissen der Zellzählungen in den Mikrokosmen WA, WB und WC sind auch bei den Intensitäten der Respiration nur geringfügige Unterschiede festzustellen. Mit Ausnahme des Mesokosmos WA am Versuchstag acht verlaufen sämtliche ermittelten Respirationsraten parallel. Die Respiration in den Ansätzen XA bis XC ist hingegen von Ansatz zu Ansatz unterschiedlich: So tritt in XB und XC am Tag 3 eine sehr starke Respiration auf, während diese im Ansatz XB deutlich schwächer ausfällt. Die Respirationsrate sinkt zum Versuchstag 8 und 11 hin ab, wobei der Mikrokosmos XB am Tag 8 eine doppelt so starke Respiration aufweist wie die beiden anderen Ansätze.

Im Falle der Respiration in den Ansätzen XA bis XC treten zeitweise Diskrepanzen in Korrelation zur Zellzahl auf. So weist der Mikrokosmos XA an den Versuchstagen 3 und 8 relativ hohe Zellzahlen, jedoch die niedrigsten Respirationsraten aller drei Mikrokosmen auf, während der Ansatz XC eine gegenläufige Tendenz zeigt. In den meisten Fällen jedoch korrelieren Respiration und Zellzahl, wie beispielsweise im Falle des Ansatzes XB am Versuchstag 8 sowie in allen drei Mikrokosmen zum Ende des Versuchs hin.

Unter Berücksichtigung beider Versuchsparameter lässt sich feststellen, dass im Falle des Ölbindemittels SuperM zwar ein Wachstum von Bakterien und eine Respiration festzustellen ist, beide Faktoren jedoch von der Zugabe des Giftstoffes Cycloheximid offenbar nicht beeinflusst werden. Sowohl die Zellzahlen als auch die Respirationsraten in allen drei Mikrokosmen verlaufen weitestgehend parallel. Dies deutet an, dass Protozoen in diesem Versuchsansatz entweder keinen Einfluss auf den Versuchsablauf nehmen oder nicht vorhanden sind.

Im Falle der Mikrokosmen, in denen das Ölbindemittel X-Oil zum Einsatz kam, konnten tendenziell Unterschiede zwischen den Verläufen der beiden untersuchten Faktoren ermittelt werden: So sanken in den Mikrokosmen XA und XC die Zellzahlen und die Respiration nach einem extremen Anstieg zu Versuchsbeginn ebenso schnell wieder ab. Diese Beobachtung konnte in derselben Form bereits für den Mesokosmenversuch gemacht werden und ist in den Abb. 3.15 und 3.16 dokumentiert. Beide Faktoren sanken zwar ebenso im Falle des Ansatzes XB ab, jedoch konnte ein deutlicher Unterschied zu XA und XC gemessen werden. Für den Mikrokosmos XC konnte eine ähnliche Beobachtung am Versuchstag 30 gemacht werden. In diesem Fall stiegen die Zellzahlen und Respiration zwischen Tag 21 und 30 im Vergleich zu XA und XB an.

In beiden genannten Fällen korreliert die Abweichung mit der Zugabe des Giftstoffes Cycloheximid. Während im Ansatz XB über den gesamten Versuchsablauf das Wachstum von Protozoen unterdrückt und somit ein ungebremses Wachstum der Bakterien ermöglicht wurde, konnten diese im Mikrokosmos XC nach Zugabe des Giftstoffes und Eliminierung der Protozoen eine Wachstumsphase einleiten. Dies deutet ebenfalls an, dass in dem Ansatz XC zu diesem Zeitpunkt noch genügend Öl und Nährstoffe für ein solches Wachstum vorhanden waren, während diese Ressourcen im Ansatz XB zu diesem Zeitpunkt bereits möglicherweise erschöpft waren.

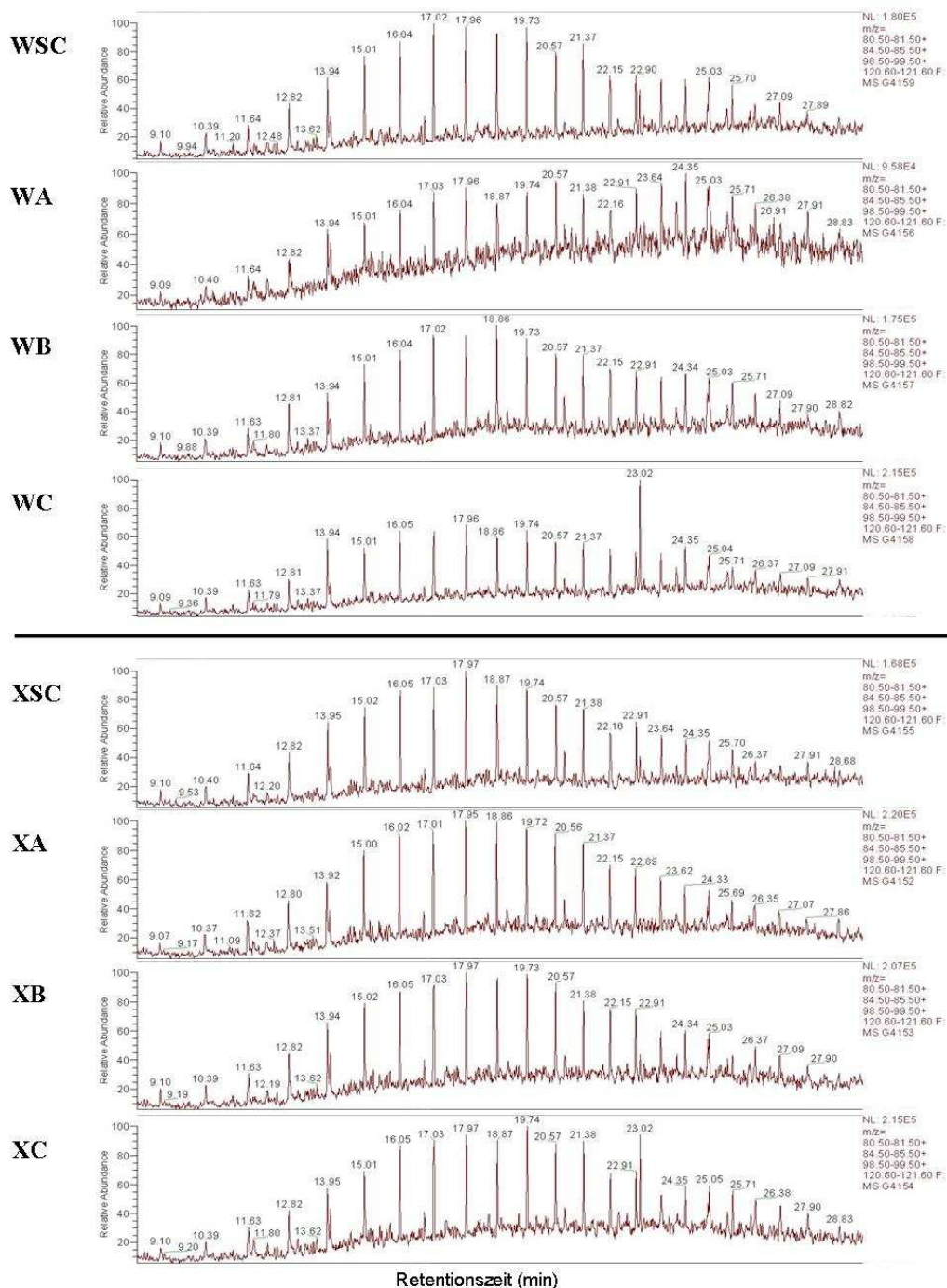
Erstaunlicherweise zeigten beide Ölbindemittel über den gesamten Versuchsablauf nicht nur unterschiedliche Eigenschaften in Hinblick auf die Bindung des Öls, sondern auch in Bezug auf die mikrobiellen Gemeinschaften. So wurde, wie in Abb. 3.24 zu erkennen, das Öl von beiden Bindemitteln vollständig adsorbiert. Im Falle von SuperM kam es jedoch weder zu einer Emulsionsbildung noch zu signifikanten Unterschieden in den Mikrokosmen infolge der Anwendung des Cycloheximids. Eine gegenteilige Beobachtung konnte für die Mikrokosmen, die mit X-Oil behandelt wurden, gemacht werden. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass beide Effekte miteinander in Verbindung stehen.

Nach Angaben des Herstellers weisen beide Ölbindemittel unterschiedliche Aufnahmekapazitäten auf: So bindet SuperM etwa viermal soviel dieses Schadstoffes wie die gleiche Menge des auf Textilien basierenden X-Oils. Somit hat SuperM eine höhere Affinität zum Öl, was möglicherweise auf das Ausgangsmaterial Polypropylen sowie auf eine spezielle industrielle Fertigungstechnik zurückzuführen ist. X-Oil setzt sich hauptsächlich aus Leder- sowie Kunststofffasern zusammen. Insbesondere der Naturstoff Leder weist dabei in der Mehrzahl hydrophobe aber auch hydrophile Eigenschaften auf. Dieser Unterschied könnte für die Emulsionsbildung im Falle des X-Oils verantwortlich sein, da sich sowohl Öl als auch Biofilme leichter von der Oberfläche lösen. Ein zweiter Faktor könnte die in Abb. 3.24 sichtbare größere Oberfläche des SuperM sein; durch die schaumartige Konsistenz mit vielen Zwischenräumen können sich Biofilme auch im Inneren des Ölbindemittels bilden, wo sie gegen mechanische Belastungen infolge der Schüttelbewegungen während der Inkubation geschützt wären. Hierdurch werden Öl und Biofilme leichter vom X-Oil abgelöst und bleiben als Emulsion in der Mikrokosmenflüssigkeit zurück.

Infolge der Emulsionsbildung in den Ansätzen XA bis XC wird die Bioverfügbarkeit des Öls aber gleichzeitig auch die Bioverfügbarkeit der an das Öl gebundenen Biomasse drastisch erhöht. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Predatoren diese potenzielle Nahrung finden im Vergleich zu den Mikrokosmen, in denen diese Biomasse an die Oberfläche des Bindemittels gebunden und konzentriert vorliegt, erheblich.

3.26 Predationsmikrokosmen - Gaschromatographische Analyse von Ölrückständen

Analog zu den gaschromatographischen Analysen im Falle der Mikro- und Mesokosmenstudie wurden auch für die Mikrokosmenversuche zum Protozoenfrass Ölrückstände analysiert, um mögliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen zu beobachten. Im Gegensatz zu dieser Analyse wurden die Chromatogramme aller Stoffe, deren Massenspektrum ein Molekül von 81 sowie 85 g/mol aufweist. Somit wurden sowohl n-Alkane als auch der interne Marker Squalen nachgewiesen. Abb. 3.26 c zeigt einen Vergleich der Ölrückstände, die nach den 30 Versuchstagen aus den Ölbindemitteln extrahiert wurden. Parallel dazu wurden die Rückstände aus den Sterilkontrollen aufgetragen.



Vorherige Seite: Abb. 3.26c Chromatogramm der GC-MS-Analyse von Ölrückständen aus den Mikrokosmen WA – WC sowie XA – XC sowie der Sterilkontrollen WSC and XSC. ; die vorliegende Darstellung zeigt ein nach Denaro et al. gefiltertes Chromatogramm, bei dem die relativen Konzentrationen der einzelnen Substanzen (Y-Achse) gegen ihre Retentionszeit (X-Achse) aufgetragen ist. Hierzu wurden die Chromatogramme aller Substanzen, deren Massenspektrum Moleküle der molaren Massen 81 und 85 g/mol aufweist vom Gesamtionenstrom subtrahiert. Somit werden nur n-Alkane, verzweigte Kohlenwasserstoffe oder n-Alkylaromaten sowie Squalen und verwandte Substanzen angezeigt. Der Gesamtionenstrom (NL), die relative Gesamtmenge der Stoffe in der jeweiligen Probe ist für jedes in der oberen rechten Ecke angegeben. Squalen erzeugt einen Peak bei der Retentionszeit 23,02.

Anhand einer gaschromatographischen Analyse von reinem Squalen konnte ermittelt werden, dass dieses einen Peak bei der Retentionszeit 23,02 min aufweist. Dieser Peak konnte jedoch nicht in allen Chromatogrammen, beispielsweise auch in den Sterilkontrollen nicht nachgewiesen werden. Der Grund hierfür könnte in einer ungleichen Verteilung des Squalens im verwendeten Öl liegen oder in einer Degradation dieses Stoffes durch Bakterien. Diese Ergebnisse zeigen, dass Squalen als interner Standard für die Biodegradation nicht geeignet ist. Ein Vergleich der Ergebnisse kann daher nur durch den Vergleich der relativen Konzentrationen anhand der Intensität der Gesamtionenströme erfolgen. Im Falle der Proben XA bis XC sind kaum Veränderungen gegenüber der Sterilkontrolle zu erkennen. Die Intensitäten der Gesamtionenströme aller Proben sind annähernd gleich groß und die Chromatogramme verlaufen relativ ähnlich. Einzig das Diagramm XC weist einen hohen Peak für Squalen auf, was darauf hindeuten könnte, dass die relative Höhe der anderen Peaks in diesem Chromatogramm niedriger ist als in jenen der Proben XA und XB.

Im Falle der Proben WA und WC sind deutliche Unterschiede zur Probe WB und der Sterilkontrolle zu erkennen: Das Chromatogramm von WA weist einen um 50% niedrigere Gesamtkonzentration auf, während WC einen ähnlich starken Gesamtionenstrom wie WSC und WB zeigen, aber niedrigere Peaks. Ebenfalls ist in WC ein hoher Peak von Squalen zu erkennen.

Neben den n-Alkanen konnten durch Anpassung der massenspektrometrischen Analyse auch aromatische Kohlenwasserstoffe, die in ihrem Massenspektrum Anthracen bzw. Phenanthren bzw. verschiedene n-Alkylanthracene bzw aufweisen, dargestellt werden. Abb. 3.26 d zeigt diese Chromatogramme, wobei jedoch kein Referenzpeak von Squalen dargestellt wurde. Wiederum können nur relative Konzentrationen anhand der Intensität des Gesamtionenstroms abgelesen werden. In der Tat sind die relativen Konzentrationen aller Proben annähernd gleich stark, zwischen den einzelnen Chromatogrammen sind jedoch keine Unterschiede zu erkennen. Obwohl nur Stoffe dargestellt werden, deren Massenspektrum vier definierte Moleküle enthält, sind in den Chromatogrammen relativ viele Peaks zu erkennen. Dies zeigt, dass das verwendete Bunker C – Öl eine enorme Anzahl an verschiedenen aromatischen Kohlenwasserstoffen enthält.

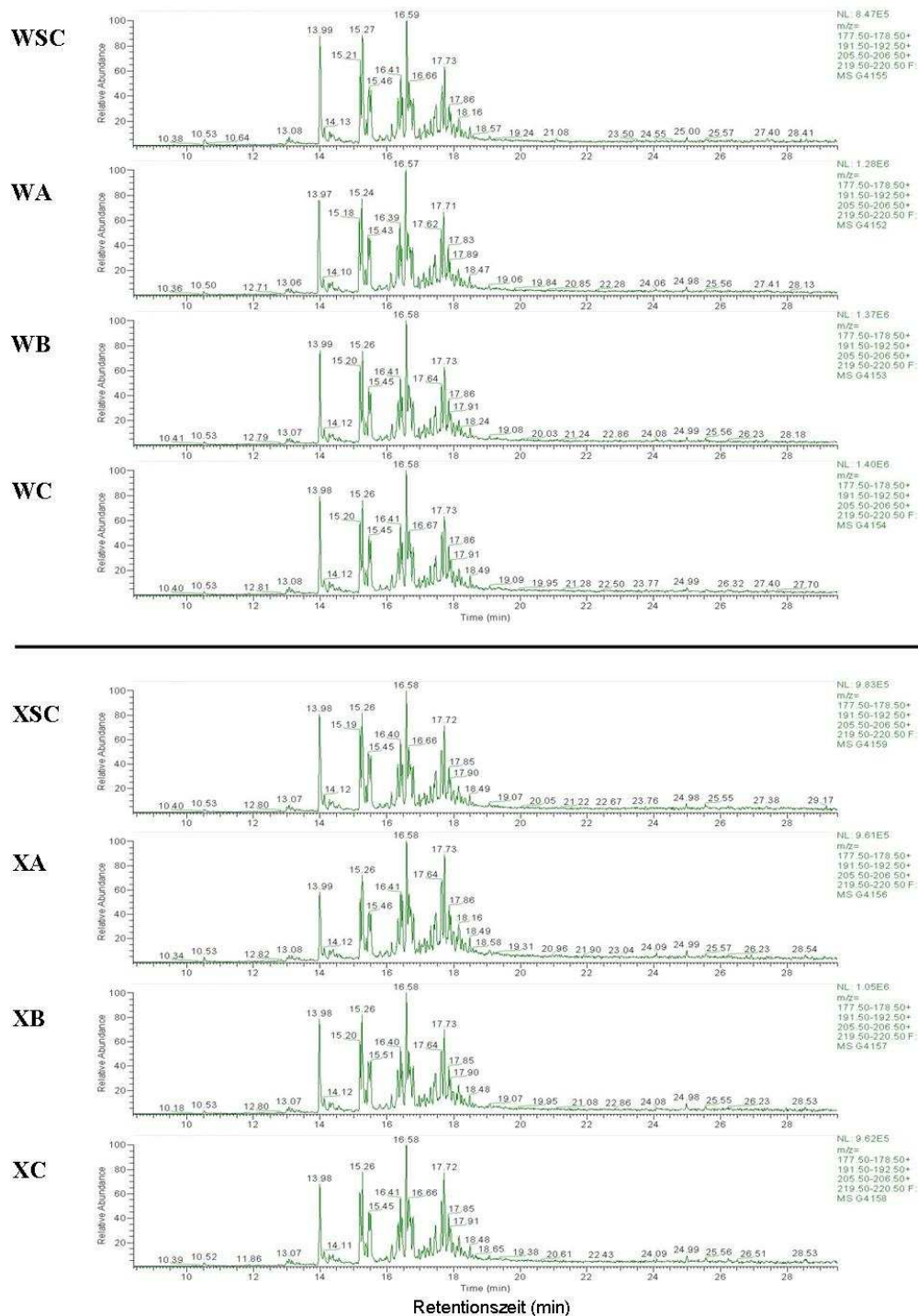


Abb. 3.26d Chromatogramm der GC-MS-Analyse von Ölrückständen aus den Mikrokosmen WA – WC sowie XA – XC sowie der Sterilkontrollen WSC und XSC. ; die vorliegende Darstellung zeigt ein nach Denaro et al. gefiltertes Chromatogramm, bei dem die relativen Konzentrationen der einzelnen Substanzen (Y-Achse) gegen ihre Retentionszeit (X-Achse) aufgetragen ist. Hierzu wurden die Chromatogramme aller Substanzen, deren Massenspektrum Moleküle der molaren Massen 178 (Phenanthren/Anthracen), 192 (Methylantracen/-phenanthren), 206 (Ethylantracen/-phenanthren) und 221 g/mol (Propylantracen/-phenanthren) aufweist vom Gesamtionenstrom subtrahiert. Somit werden nur polyaromatische und verwandte Substanzen angezeigt. Der Gesamtionenzahl (NL), die relative Gesamtmenge der Stoffe in der jeweiligen Probe, ist für jedes in der oberen rechten Ecke angegeben.

Die gaschromatographische Analyse der Ölrückstände hat gezeigt, dass aromatische Kohlenwasserstoffe mit drei oder mehr Benzolringen in keinem der Mikrokosmen abgebaut wurden. Da es sich bei solchen polyaromatischen Verbindungen aber aufgrund dieser Vielzahl an Ringsystemen um chemisch sehr stabile Moleküle handelt, war vermutlich die Versuchszeit zu kurz, um Veränderungen zu sehen. Erstaunlicherweise unterliegt das an SuperM gebundene Öl scheinbar einem stärkeren Abbau als das an X-Oil gebundene. Da jedoch ein Teil des Öls in Folge der Emulsionsbildung von der Oberfläche des X-Oils abgelöst wurde, könnte das Ergebnis dieser Analyse verzerrt worden sein, da das emulgierte Öl einer stärkeren Biodegradation ausgesetzt worden sein, wodurch der Anteil nicht abgebauten Öls im Falle des X-Oils, zum Beispiel an nicht exponierten Stellen des Ölbindemittels höher ist, als im Falle des Ölbindemittels SuperM, an dessen Oberfläche auch teilweise abgebautes Öl gebunden war.

Ein Vergleich der Mikrokosmen WA bis WC zeigt, dass eine schwächere Biodegradation des Öls im Mikrokosmos WB stattfand, welcher bereits zu Versuchsbeginn mit Cycloheximid behandelt wurde

3.27 Versuche zur Lagerung der Biomasse von *Alcanivorax borkumensis*

Eines der entscheidenden Probleme bei der biotechnologischen Bekämpfung von Ölverschmutzungen im Feld ist die Verfügbarkeit und Zufuhr von ölabbauenden Bakterien. Für diese Bioaugmentation werden vielfach Flüssigkulturen oder Lyophyllisate von Bakterien eingesetzt; hierbei ergeben sich bei der Anwendung mehrere Probleme: analog zu der Problematik bei der Anwendung von Stickstoff- und Phosphatdüngern können sowohl Flüssigkulturen als auch pulverförmige Lyophyllisate im Meerwasser leicht ausgeschwemmt werden. Aus Lyophyllisaten geht ferner nur ein geringer Teil der Zellen in aktiver Form hervor, da viele Bakterien im Prozess der Gefriertrocknung geschädigt werden⁴¹. Flüssigkulturen hingegen sind aus praktischen Gründen nicht effektiv einsetzbar, da die Anzüchtung von *A. borkumensis* bis zu zehn Tage in Anspruch nehmen kann und ein Transport relativ schwer umzusetzen ist.

In diesem Versuch sollte die natürliche Fähigkeit von *A. borkumensis* zur Bildung eines Biofilms auf Ölen genutzt werden, um das Problem einer Ausschwemmung von Bakterienzellen zu vermeiden. Die Biofilme wurden dabei auf Kohlenwasserstoffen, die auf einem Trägermaterial, in diesem Falle dem Ölbindemittel SuperM, aufgebracht wurden, angezüchtet. In einem zweiten Schritt sollten die Zellen von *A. borkumensis* zusammen mit dem Ölbindemittel konserviert werden.

In einer Reihe von Vorversuchen wurden hierzu verschiedene Konservierungsmethoden getestet: Das Inokulum aus *A. borkumensis* wurde luftgetrocknet, gefriergetrocknet, in 30% Glycerin eingefroren und bei -20°C gelagert oder schlicht in Seewasser bei +4°C gelagert.

Hierbei zeigte sich, dass sowohl Trocknung als auch Gefriertrocknung zu einem Totalverlust der mikrobiellen Aktivität des Inokulums führen, während bei einer Lagerung bei 4°C bzw. -20°C auch nach sechs Monaten eine Aktivität nachzuweisen war. Das Kriterium für diese Aktivität war ein so genannter Sheen screen – Test, der den genauen Titer der emulsionsbildenden Bakterien in einer Probe anzugeben vermag.

Wie bereits beschrieben wurde ausgehend von diesen Erfahrungen eine Methode entwickelt, bei der Biofilme von *A. borkumensis* auf der Oberfläche von SuperM zunächst mit dem Schutzmittel Dimethylsulfoxid behandelt und darauf durch Inkubation bei -80°C schockartig gefroren wurden. Das entscheidende Kriterium für die Effektivität dieser Methode und den Einsatz der gelagerten Materialien ist hierbei die Anzahl der Bakterien, die nach der Lagerung zu Wachstum und Teilung fähig ist sowie die Fähigkeit zur Emulsionsbildung.

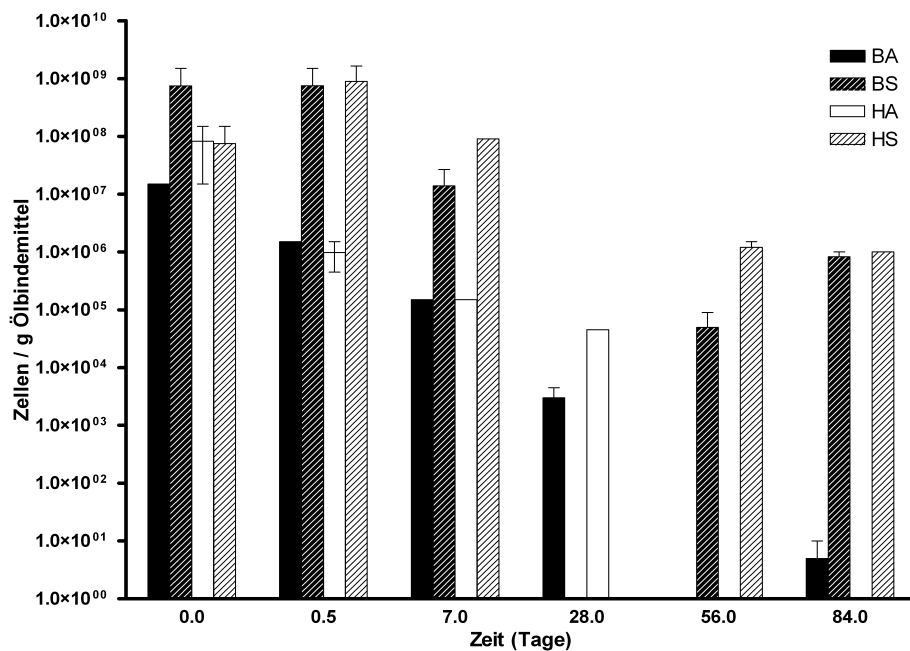


Abb. 3.27a: Ergebnisse der Sheen screen – Methode; alle angegebenen Werte beziehen sich auf die hochgerechnete Gesamtzahl an emulsionsbildenden Zellen auf jeder der untersuchten Kugeln aus SuperM. Bei dem Messzeitpunkt 0 handelt es sich um Probe, die vor dem Gefrieren, bei dem Messzeitpunkt 0,5 um eine Probe, die nach dem Gefrieren genommen wurde. Die vier Ansätze enthielten entweder eine Reinkultur von *A. borkumensis* (-A) oder die natürliche Flora des Meerwassers (-S) sowie entweder das Schweröl Bunker C (B-) oder Hexadekan (H-) als Reinstoff. Für die Ansätze BS und HS am Tag 28 konnten aufgrund einer Kontamination keine zuverlässigen Werte ermittelt werden.

Die Daten in der Abb. 3.27a geben die Ergebnisse des Sheen screen – Tests wieder. Zwischen den vier Ansätzen sind deutliche Unterschiede zu erkennen: so unterscheiden sich beispielsweise die Ansätze, die auf Reinkulturen von *A. borkumensis* basieren, von den auf Meerwasser basierenden. Bei diesen Ansätzen liegen die Zahlen emulsionsbildender Bakterien bereits zu Versuchsbeginn nicht nur teilweise um den Faktor 100 höher sondern es sind auch bis zum Versuchsende nach sechs Monaten solche nachweisbar. In den Ansätzen BA und HA hingegen sind nach 56 Tagen kaum Zellen mit der Fähigkeit zur Emulsionsbildung mehr erkennbar.

Ein Rückgang der Zellzahlen ist dabei für alle Ansätze zu erkennen, er vollzieht sich jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. In den Ansätzen BS und HS liegen die ermittelten Zellzahlen vor und

nach dem Gefrieren auf demselben Niveau, während bei den Ansätzen BA und HA ein Rückgang um drei Zehnerpotenzen zu verzeichnen war. Wie bereits erwähnt sinkt die Zahl der emulsionsbildenden Bakterien in diesen beiden Ansätzen im Laufe der ersten acht Wochen der Lagerung auf null. Auch bei den Ansätzen BS und HS ist dieser Rückgang festzustellen gewesen, wobei auf den Proben von BS zwischen 10 und 100.000 Zellen mit der Fähigkeit zur Emulsionsbildung, auf den Proben von HS jedoch eine tausendfach höhere Zahl von Bakterien nachzuweisen waren.

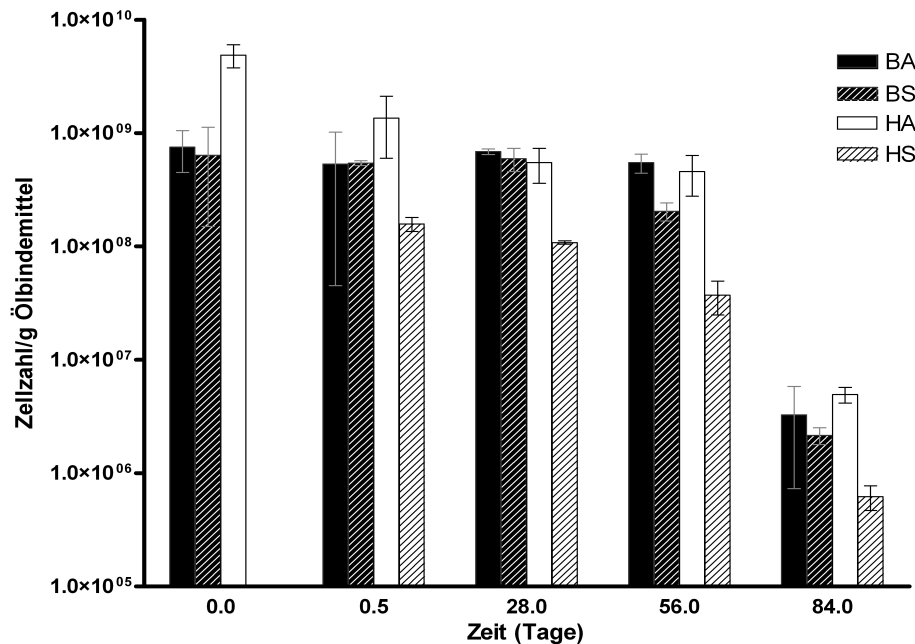


Abb. 3.27b: Ergebnisse der MPN – Methode; alle angegebenen Werte beziehen sich auf die hochgerechnete Gesamtzahl an emulsionsbildenden Zellen auf jeder der untersuchten Kugeln aus SuperM. Bei dem Messzeitpunkt 0 handelt es sich um Probe, die vor dem Gefrieren, bei dem Messzeitpunkt 0,5 um eine Probe, die nach dem Gefrieren genommen wurde. Die vier Ansätze enthielten entweder eine Reinkultur von *A. borkumensis* (-A) oder die natürliche Flora des Meerwassers (-S) sowie entweder das Schweröl Bunker C (B-) oder Hexadekan (H-) als Reinstoff. Für den Ansatz HS am Tag 0 konnte aufgrund einer Kontamination kein zuverlässiger Wert ermittelt werden.

Die Abbildung 3.27b gibt die experimentell ermittelte Zahl kultivierbarer Bakterien, die auf ONR 7 – Medium wachsen und Kohlenwasserstoffe verwerten können, wieder. Wie bereits im Falle der Sheen screen – Methode ist über den gesamten Versuch ein Rückgang der Zellzahl zu beobachten. Waren in sämtlichen Ansätzen nach dem Gefrieren und Auftauen noch etwa 10^9 Zellen pro g Ölbindemittel nachzuweisen, so sank diese Zahl innerhalb der folgenden drei Monate der Lagerung auf 5×10^6 Zellen ab. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Sheen screen – Methode unterscheiden sich die Zahlen kultivierbarer ölabbauender Mikroorganismen der einzelnen Ansätze über den gesamten Versuchsverlauf nicht wesentlich voneinander.

Es ist zu beobachten, dass die Zellzahlen des Ansatzes HA in der Regel etwas höher liegen als jene der Ansätze BA und BS, welche wiederum etwas höher liegen als jene des Ansatzes HS. Zwischen allen vier Ansätzen liegt über den gesamten Versuchverlauf eine Diskrepanz von unter einer Zehnerpotenz. Darüber hinaus ist im Gegensatz zur Sheen screen – Methode kein wesentlicher Unterschied zwischen den Zellzahlen der einzelnen Ansätze unmittelbar vor und nach dem Gefrieren festzustellen.

Die Ergebnisse der MPN-Methode zeigen deutlich, dass eine Lagerung von Biomasse auf dem hier gezeigten Wege prinzipiell möglich ist, zumal eine Kultivierung von Zellen aus gefrorener und wieder aufgetauter Biomasse möglich ist. Dabei sind nach unmittelbarem Auftauen sogar nahezu keine Verluste in der Zellzahl, in der Folge nur ein geringer Rückgang der Zellzahl kultivierbarer Bakterien auf der Oberfläche des Ölbindemittels festzustellen. Diese Erkenntnis deutet an, dass die hier gezeigte Methode noch Raum für Verbesserungen bietet. Überraschenderweise sind in Bezug auf die Emulgation des Schweröls Bunker C im Rahmen des Sheen screen–Tests deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen zu erkennen gewesen: So wiesen lediglich die Ansätze BS und HS nach zwei Monaten noch diese Fähigkeit auf. Im Falle von HS korreliert diese Beobachtung mit einer geringen Zahl kultivierbarer Bakterien, was darauf hindeutet, dass der Titer emulsionsbildender Bakterien in diesem Ansatz besonders hoch ist.

Diese Beobachtungen zeigen, dass nicht nur die Lagerungsmethode, sondern auch die Anzuchtbedingungen der gelagerten Biomasse von entscheidender Bedeutung sind. So scheint sowohl die Wahl des Mediums bzw. der verwendeten mikrobiellen Biomasse, aber auch die Wahl des für die Anzucht verwendeten Öl einen erheblichen Einfluss auf die Lagerfähigkeit kultivierbarer und emulsionsbildender Mikroben zu nehmen. Unterschiede zwischen der mit der MPN-Methode ermittelten Zellzahl der Ansätze BA und HA können so zum Beispiel anhand des Substratspektrums des für die beiden Ansätze verwendeten Bakteriums *A. borkumensis* erklärt werden: Dieses kann nur einen Teil des Bunker C – Öls, jedoch Hexadekan vollständig verwerten. Im Falle des Substrats Bunker C werden in den auf Meerwasser basierenden Ansätzen BS und HS höhere Zellzahlen für BS erreicht, da in diesen auch Bakterien, die aromatische Kohlenwasserstoffe abbauen wachsen können.

Die Sheen screen - Methode zeigte im Gegensatz zur MPN-Methode starke Unterschiede der Ansätze BS und HS im Vergleich zu BA und HA. Hierbei fällt besonders der vollständige Rückgang der Zellzahlen von BA und HA ab dem Versuchstag 56 auf. Dies deutet an, dass die Biofilme mariner ölabbauender Mischkulturen, die aus unverschmutztem Meerwasser hervorgingen, durch die hier verwendete Prozedur der Konservierung deutlich weniger geschädigt werden, als Reinkulturen von *A. borkumensis*. Im hier vorliegenden Fall deutet sich an, dass Mitglieder dieser mikrobiellen Gemeinschaft einen positiven Effekt auf die ölabbauenden Bakterien haben. Eine mögliche Erklärung wäre in der Architektur des Biofilms zu suchen. Durch Produktion bislang unbekannter Substanzen könnten die Biofilme stabiler oder toleranter gegen die Lagerungsprozedur, insbesondere den Gefrierprozess geworden sein als Biofilme, die ausschliesslich von *A. borkumensis* gebildet wurde. Diese Theorie muss jedoch in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung des Potenzials einer biotechnologischen Anwendung, die auf der Verwendung des ölabbauenden Meeresbakteriums *Alcanivorax borkumensis* in Kombination mit dem Ölbindemittel X-Oil basiert. Im Laufe des Projektes sollten zunächst die Verträglichkeit der ölabbauenden Mikroorganismen mit dem Ölbindemittel untersucht werden sowie Rahmenparameter für eine konkrete Anwendung bestimmt werden. Obwohl *A. borkumensis* schon in einer großen Zahl von Studien untersucht wurde^{48, 50, 53, 54}, sind keine Daten über die Interaktion mit Ölbindemitteln vorhanden.

Ausgehend von den in dieser Phase ermittelten Ergebnissen sollte ein Prototyp einer Anwendung für den Ölabbau im Meer entwickelt werden. Ziel war die Schaffung einer Anwendung, die einfach zu handhaben ist, keinen technischen Aufwand darstellt, keine Wartung benötigt und das vorhandene Methodenspektrum des marinen Ölabbaus sinnvoll ergänzen kann: Hierbei ergibt sich eine Nische für eine biotechnologische Anwendung insbesondere in flachen Küstengewässern oder schwer zugänglichen Küstenabschnitten sowie in Naturschutzgebieten, in denen keine chemische Dispergatoren eingesetzt werden können.

Zur Einschätzung der Wirksamkeit der verwendeten Komponenten wurden kulturunabhängige Analysen der mikrobiellen Gemeinschaften gekoppelt mit mikroskopischen, chemischen und physikalischen Methoden zur Bestimmung von Zellzahl, Verbrauch der einzelnen Bestandteile des Öls sowie des Sauerstoffverbrauchs. Ferner sollten entscheidende Probleme für die industrielle Umsetzung dieser biotechnologischen Anwendungen, zum Beispiel die Lagerungsfähigkeit, die Zufuhr geeigneter Bakterienkulturen sowie der Einfluss natürlicher Regelmechanismen des Ölabbaus untersucht werden, um einer zukünftigen Anwendung von *A. borkumensis* in Verbindung mit Ölbindemittel im Meer den Weg zu ebnen.

4.1 Mikrokosmenstudie und Rolle von *Alcanivorax borkumensis*

Der biologische Abbau von Kohlenwasserstoffen erfordert vier wesentliche Komponenten: eine ausreichende Wassertemperatur, eine hohe Sauerstoffkonzentration, Nährstoffe wie Stickstoff und Phosphat^{25, 29, 32, 39, 44}, sowie eine hohe Konzentration an ölabbauenden Bakterien^{27, 44, 47}. Wie einleitend erwähnt führen gute Werte der ersten drei Faktoren im Meerwasser in der Regel automatisch zum letztgenannten Punkt, da in diesem ölabbauende Bakterien in geringer Konzentration vorhanden sind. Während die Wassertemperatur des Meeres technisch nicht beeinflusst werden kann, ist Sauerstoff in der Regel in ausreichender Menge im Meerwasser gelöst. Somit konzentrieren sich die biotechnologischen Eingriffe während der Bioremediation hauptsächlich auf die Erhöhung der Nährstoffkonzentrationen im Meer. Mit Ausnahme einiger Randmeere wie der Ostsee enthält Seewasser nur geringe Mengen an Nährstoffen, wobei insbesondere Stickstoff, Phosphat und Eisen limitierende Nährstoffe sind^{32, 70}.

In einer ersten Versuchsreihe wurden zunächst neben der Biostimulation auch Bioaugmentation und der Einsatz von Ölbindemitteln einzeln sowie in Kombinationen simuliert. Diese Versuchsreihe zeigte dabei zunächst, dass Biostimulation durch lösliche Nährstoffe ein elementar wichtiger Faktor unter den gewählten Bedingungen war.

Dabei konnte in Abhängigkeit von der Nährstoffzugabe nicht nur eine massive Emulsionsbildung beobachtet werden sondern auch durch statistische Methoden eine Verschiebung der Mikrobengemeinschaften zugunsten von *A. borkumensis*. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in einer Vielzahl von Studien gemacht: So wurde *A. borkumensis* nicht nur in Anreicherungskulturen oder auch vielfach in biotechnologischen Mikrokosmen^{26,50,105} nachgewiesen sondern auch an ölverschmutzten Stränden und Küstenabschnitten angetroffen^{48, 49, 53}. Die hohe Konkurrenzfähigkeit dieses Mikroorganismus in ölverschmutztem Meerwasser ist dabei wie bereits erwähnt auf seine besonderen Anpassungen zurückzuführen: eine Genomsequenzierung und –annotation dieses Bakteriums zeigte unter anderem drei Kopien von Genen für das Cytochrom P450 sowie zwei Kopien des *alkB*-Gens für Alkylhydroxylasen, die *A. borkumensis* zu einem optimal an den Abbau von Kohlenwasserstoffen angepassten Organismus machen; so wurden ferner eine Vielzahl an Transportproteinen für Stickstoffverbindungen und Phosphate nachgewiesen, die eine höhere Affinität zu diesen Nährstoffen besitzen als jene von anderen Meeresbakterien.

Ein weiterer Faktor ist die Produktion von Biotensiden, hauptsächlich membranständigen Glukolipide, die für die im Versuch beobachtete Emulsionsbildung verantwortlich sein könnten⁵⁶. Die an der äusseren Membran verankerten Glukolipide sorgen auch für eine Adhäsion der Zellen an die Oberfläche des Öls, wie sie sowohl in den Abb. 3.2a als auch 3.12a dargestellt ist. Ferner werden auch freie Biotenside von diesem Mikroorganismus abgegeben⁵⁶. Obwohl nicht in der ersten Mikrokosmenstudie erkennbar, konnten in der späteren Mesokosmenstudie zeitweise große Mengen an Schaum (Abb. 3.10 b) beobachtet werden, die auf Biotenside hinweisen. Ebenso konnte in den Predationsmikrokosmen festgestellt werden, dass sich Öl und Biofilm von X-Oil, nicht aber von dem Bindemittel SuperM lösen, was möglicherweise auf Biotenside zurückzuführen ist. Hierbei besteht jedoch die Möglichkeit, dass neben *A. borkumensis* auch andere Bakterien in den Kulturen Biotenside produzieren können.

Die dritte Fähigkeit, die *A. borkumensis* zu einem hervorragend an den Abbau von Öl im Meer angepassten Organismus macht, ist die Fähigkeit, auch Biofilme zu bilden. Hierbei handelt es sich im Hinblick auf die Biotensidproduktion um zwei gegensätzliche Strategien zur Erschliessung des Öls als Nährstoff, die in einem Organismus vereint werden. Ein interessanter Faktor dieses Bakteriums ist sein eingeschränktes Substratspektrum, welches einen erheblichen Einfluss auf seine Ökologie hat: So werden nur wenige Kohlenwasserstoffe verwendet^{48, 54, 61}, der Organismus verfügt aber über das Potenzial, Nährstoffe sehr viel besser aufzunehmen, als die übrige Mikroflora des Meeres⁵⁵. *Alcanivorax borkumensis* ist durch dieses Ungleichgewicht von limitiertem Substratspektrum und überlegener Nährstoffaufnahme ideal geeignet, um plötzlich auftretende Mengen von Kohlenwasserstoffen in Lösung zu bringen, ihre Bioverfügbarkeit zu erhöhen und teilweise abzubauen. Durch die Emulsionsbildung werden darüber hinaus Kohlenwasserstoffe auch anderen Mikroorganismen zugänglich gemacht und die Bioverfügbarkeit dieser Schadstoffe erhöht.

Unter Berücksichtigung dieser besonderen Fähigkeiten von *A. borkumensis* ist es nicht verwunderlich, dass die Zufuhr von Biomasse dieses Bakteriums in den oben gezeigten Versuchen einen Einfluss auf die Geschwindigkeit von Ölabbau, Emulsionsbildung und Verschiebung der mikrobiellen Gemeinschaften hat: So konnte im Rahmen der Mikrokosmenstudie gezeigt werden, dass in Kulturen, in denen unsterilem Meerwasser Biomasse von *A. borkumensis* zugesetzt wurde, eine schnellere Verschiebung der mikrobiellen Gemeinschaft zugunsten dieses Organismus innerhalb von sieben

anstelle von 21 Tagen stattfindet. Dies führte in den entsprechenden Mikrokosmen zu einer schnelleren Emulsionsbildung sowie zu einem stärkeren Abbau von Kohlenwasserstoffen innerhalb der Versuchszeit. So wurden mehr als 95% der Kohlenwasserstoffe in augmentierten Mikrokosmen abgebaut, während in solchen ohne Bioaugmentation bis zu 90% der Ölbestandteile verwertet wurden. Erstaunlicherweise konnte sowohl in den Meerwasser-Mikrokosmen als auch in den mit *A. borkumensis* angereicherten Mikrokosmen ein Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen beobachtet werden. Im Gegensatz zu Kontrollmikrokosmen, die nur *A. borkumensis* enthielten, wurden über 90% der aromatischen Kohlenwasserstoffe – also annähernd die doppelte Menge – abgebaut. Offensichtlich werden trotz des massiven Wachstums von *Alcanivorax borkumensis* andere Mikroorganismen, die aromatischen Kohlenwasserstoffe abbauen, nicht behindert, sondern wie in Abb. 3.3 sichtbar in ihrer Tätigkeit gefördert.

Der Grund hierfür könnte die erhöhte Bioverfügbarkeit des Öls sein, von der auch diese Organismen profitieren. So konnte in einer Mikrokosmenstudie gezeigt werden, dass infolge der Biotensidproduktion von *A. borkumensis* das Wachstum von *Cycloclasticus pugettii* gefördert wird¹⁰⁶.

Bioaugmentation mittels *A. borkumensis*

Die oben präsentierten Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Bioaugmentation mit *A. borkumensis* prinzipiell möglich und sinnvoll ist, da durch diese ein natürlicher Trend, die Umstellung der mikrobiellen Gemeinschaft zugunsten dieses Organismus, um 66% beschleunigt wird. Von entscheidender Bedeutung sind dabei neben der Emulgation¹⁰⁶ offensichtlich auch die weiteren oben beschriebenen Fähigkeiten von *A. borkumensis*, insbesondere die Biofilmbildung, die bakterielle Zellmasse auf dem Öl immobilisiert. Bioaugmentation ist eine der umstrittensten Methoden in der biotechnologischen Fachliteratur. Dies wird besonders deutlich beim Vergleich zweier Fachartikel, die nahezu gleichzeitig publiziert wurden, aber gegensätzliche Standpunkte vertreten: So attestieren El Fantroussi et al. ob der vielen erfolgreichen Experimente der Bioaugmentation eine hohe Wirksamkeit¹⁰⁷, während Thompson et al. diese aufgrund der hohen zeitlichen und räumlichen Komplexität der einzelnen Abbauvorgänge in Frage stellen⁴⁷.

Eines der bemerkenswertesten Experimente wurde in der Folge der Havarie des Öltankers „Exxon Valdez“ durchgeführt. Da vor allem Bereiche innerhalb eines Naturschutzgebietes betroffen waren, konnte weder mit schwerem Räumgerät, Hochdruckreinigungsgeräten oder Dispergatoren gearbeitet werden⁴¹. Im Rahmen eines Feldversuches wurde sowohl mit Biostimulation als auch mit Bioaugmentation gearbeitet, wobei die Biostimulation sehr erfolgreich, die Ergebnisse der Bioaugmentation nicht eindeutig waren^{40 - 42}. In der Tat sind vielfach Bioaugmentationsstudien durchgeführt worden, wobei in der Regel Organismen im Labor aus verschmutzten Proben angereichert, isoliert, identifiziert und schließlich in Form von Kulturen wieder in verschmutzte Bereiche eingefügt wurden^{108, 109}. Obwohl die Ergebnisse dieser Studien durchaus vielversprechend waren, konnte bislang keine Bioaugmentationsstrategie zur Marktreife gebracht werden.

Ein großer Teil der Studien zur Bioaugmentation befasst sich mit terrestrischen Habitaten, wobei unterschiedlichste Organismen verwendet wurden, so zum Beispiel *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Arthrobacter*, *Comamonas sp.* und viele weitere Gattungen von Bakterien für diesen Zweck eingesetzt^{47, 48}. Trotz dieser breiten Palette an potenziellen Kandidaten für die Bioaugmentation gibt es bislang

keinen allgemein verwendbaren Organismus, da nicht nur Öle stark in ihrer Zusammensetzung sondern auch Habitate in ihren abiotischen Faktoren schwanken.

Dies ist insbesondere in Böden und Sedimenten von Bedeutung, da Nährstoff- und Sauerstoffgradienten vorliegen. Meerwasser bietet in diesem Falle eine Ausnahme, da es in seiner Salinität, Zusammensetzung und Sauerstoffgehalt mit Ausnahme von Randmeeren oder Flussmündungen weltweit relativ gleichförmig ist. In der Tat wurde durch Miyasaka et al. eine Bioaugmentationsstudie mit dem kohlenwasserstoffabbauenden Bakterium *Cycloclasticus* sp. durchgeführt. Hierbei wurde Naphtalen, ein polyaromatischer Kohlenwasserstoff, mittels verschiedener Strategien im Meerwasser abgebaut. Ein Vergleich der verschiedenen Methoden zeigte eine positive Auswirkung der Bioaugmentation, wobei einschränkend festgestellt wurde, dass diese geringer waren als die Auswirkungen durch Biostimulation¹⁰⁸.

Thompson et al. stellten dabei in einem Fachartikel fest, dass der Erfolg von Bioaugmentationsstrategien in erheblichem Masse von der Wahl der beigefügten Mikroorganismen abhängt⁴⁷. In diesem Zusammenhang scheint *A. borkumensis* für den Ölabbau in diesem Medium optimal angepasst zu sein und ist für eine biotechnologische Anwendung im Meer eine naheliegende Wahl. In den oben präsentierten Mikrokosmenversuchen konnte in der Tat gezeigt werden, dass eine Zugabe von *A. borkumensis* einen Effekt auf die mikrobiellen Gemeinschaften hat: So wurde anhand der RISA-Profile nachgewiesen, dass infolge einer Zugabe von Biomasse dieses Organismus eine schnellere Umstellung der mikrobiellen Gemeinschaften zu einer von *A. borkumensis* dominierten Kultur vollzogen wurde. Parallel hierzu wurde eine schnelle Emulsionsbildung, die innerhalb von weniger als sieben Tagen auftrat, beobachtet. Vergleichbare Ansätze ohne Bioaugmentation zeigten eine weniger dichte Emulsion, die sich erst nach 14 bis 21 Tagen bildete.

Bioaugmentation mittels ölabbauender Konsortien

Weitere Studien beschreiben die Verwendung künstlich im Labor zusammengestellter Konsortien von Mikroorganismen⁴⁷. Der Vorteil einer solchen Strategie liegt in der Bereitstellung einer optimal an die Umweltbedingungen im verschmutzten Bereich angepassten mikrobiellen Gemeinschaft, die die bereits vorhandene natürliche Flora ersetzt, ergänzt oder die natürliche Verschiebung der Gemeinschaft beschleunigt. Hierbei bilden sich Konsortien aus einigen wenigen Organismen, die individuell kultiviert und als Mischkultur eingesetzt werden.

In der unter 3.1 gezeigten Mikrokosmenstudie wurde anhand der gaschromatographischen Analyse der Ölrückstände nachgewiesen, dass verzweigte und polyaromatische Kohlenwasserstoffe nur in Mikrokosmen, in denen Mitglieder der natürlichen Mikroflora des Meeres vorhanden waren, abgebaut wurden. Eine „Arbeitsteilung“ beim Abbau verschiedener Arten Kohlenwasserstoffen in Gemischen wie Roh- oder Schweröl ist in verschiedenen Studien beschrieben. So berichten Yakimov et al. aber auch Kasai et al. von einem zeitlich getrennten Auftreten von *A. borkumensis* gefolgt von einer Blüte von *Cycloclasticus pugettii*^{50, 51}. Wie der Name dieses aussergewöhnlichen Vertreters der *Gammaproteobacteria* bereits sagt, handelt es sich um einen Mikroorganismus, der mittel Dioxygenasen Benzol-Ringe öffnen und somit den Abbau von aromatischen und polyaromatischen Kohlenwasserstoffen einleiten kann. *C. pugettii* trat im Falle einer Mesokosmenstudie⁵⁰ etwa vier Wochen nach einer Blüte von *A. borkumensis* in großer Zahl auf, was durch weitere Studien unterstützt wurde²⁷. *Cycloclasticus pugettii* stellt dabei ähnliche Ansprüche an seine Umwelt wie *A.*

borkumensis, wobei es sich hier um einen obligaten Abbauer aromatischer Kohlenwasserstoffe handelt⁶⁵. Jedoch scheint die Aufnahme und Verwertung von Nährstoffen im Falle von *A. borkumensis* effizienter abzulaufen, wodurch eine Blüte von *C. pugettii* erst stattfinden kann sobald die Kohlenstoffquellen von *A. borkumensis* – die aliphatischen Kohlenwasserstoffe im Öl – aufgebraucht sind. In der oben präsentierten Mikrokosmenstudie konnte *C. pugettii* in den DGGE-Profilen nicht nachgewiesen werden. Da jedoch selbst innerhalb der ersten 36 Tage ein Abbau der aromatischen Kohlenwasserstoffe stattfindet, müssen andere Mikroorganismen für diesen verantwortlich sein. In der Tat konnten erst im Laufe der Mesokosmenstudie Organismen identifiziert, die in enger Verwandtschaft zu *Yeosuana aromativorans* und *Lutibacterium annuloederans* stehen.

Hierbei wurde das mit *Y. aromativorans* verwandte Bakterium bereits 14 Tage nach Versuchsbeginn sowohl in der Mesokosmenflüssigkeit als auch auf der Oberfläche des X-Oils nachgewiesen. Eine 16S rDNA-Sequenz mit hoher Ähnlichkeit zu *L. annuloederans* wurde hingegen zuerst nach 24 Tagen in der Mesokosmenflüssigkeit beobachtet. Diese Diskrepanz zu den übrigen Studien könnte durch die geographische Lage und die Besonderheiten des Helgoländer Felssockels zu erklären sein: So wurde *C. pugettii* bislang im Gelben Meer vor Japan und im Mittelmeer isoliert, in denen relativ hohe Wassertemperaturen vorliegen⁵⁸. Das Meerwasser vor Helgoland hingegen erreicht minimale Wintertemperaturen von 0 – 4°C und maximale Temperaturen von 16 – 20°C, was etwa 5 – 10°C niedriger liegt als in den oben genannten Regionen¹³⁹. Eine weitere Besonderheit des Meerwassers vor Helgoland ist die Anwesenheit großer Mengen von Braunalgen in den Tangwäldern des Helgoländer Felssockels, die große Mengen an Polyphenolen und aromatischen Kohlenwasserstoffen enthalten¹³⁸. In der Tat wurden durch Radwan et al. ölabbauende Bakterien auf Biofilmen, die auf der Oberfläche von Makroalgen wachsen entdeckt¹¹¹. Die Entdeckung dieser Organismen mittels kulturunabhängiger Methoden deutet an, dass diese Organismen an dem Abbau dieser Fraktion des Bunker C – Schweröls beteiligt war, jedoch muss diese Fähigkeit erst durch eine Anreicherung, Isolierung und Identifikation der entsprechenden Organismen bewiesen werden.

In diesem Zusammenhang wäre die Herstellung eines synthetischen Konsortiums für den Abbau von Bunker C in der Nordsee möglich, wobei der Sinn einer solchen Zusammenstellung fraglich ist. Sowohl die Studien von Yakimov et al. als auch die Ergebnisse der Mesokosmenstudie deuten an, dass es eine zeitliche Abfolge des Auftretens der einzelnen Organismen gibt, die möglicherweise mit der effektiveren Nährstoffaufnahme von *A. borkumensis* zusammenhängt⁵⁰. In diesem Fall wäre die Zugabe anderer Organismen als *A. borkumensis* nicht sinnvoll, da dieser die vorhandenen Nährstoffe verstärkt aufnimmt. Ferner ist die Zusammenstellung eines solchen Konsortiums für eine biotechnologische Anwendung relativ kompliziert. Thompson et al. stellen in diesem Zusammenhang fest, dass eine die Wahl bestimmter kultivierbarer Bakterien aus einem verschmutzten Habitat, eine Rekultivierung und Bioaugmentation der Komplexität der physiologischen Prozesse und der Spezifität der einzelnen verschmutzten nicht gerecht werden kann⁴⁷.

4.2 Scale-up der Mikrokosmen und etablierte Reinigungsmethoden

Bei genauerer Betrachtung der Vielzahl an Studien zum biologischen Ölabbau in marinen Systemen, tritt trotz aller Unterschiede ein gemeinsamer Nenner auf - der auch in dieser Studie angewandte Organismus *Alcanivorax borkumensis*. Wie bereits von Yakimov et al., Syutsobo et al. sowie Hara et al. festgestellt, hat dieser Organismus ein hohes Potenzial für die biotechnologische Verwendung in Meerwasser, was auf den einzigartigen Lebensstil dieses Organismus zurückzuführen ist ^{14, 26, 27, 37, 48, 49, 50, 105}.

Es handelt sich scheinbar um einen Primärbesiedler von Öl, einem hydrophoben Stoffgemisch, das in eine hydrophile Umgebung gelangt. Dabei ist *A. borkumensis* Lebensraum die Grenzfläche zwischen diesen Gegensätzen. Nur wenige andere marine Organismen verfügen über die Fähigkeiten, an dieser Grenzfläche zu existieren oder sind derartig extrem an diese angepasst. Es handelt sich dabei um eine einzigartige ökologische Nische, die besondere Anpassungen erfordert, da sich chemische und physikalische Besonderheiten des Öls negativ auf die Membranen der Bakterien ausüben.

Durch seine Lebensweise an der Grenzfläche zwischen Öl und Wasser macht *A. borkumensis* den Nährstoff Öl auch anderen Organismen zugänglich, erhöht seine Bioverfügbarkeit und bereitet weiteren spezialisierten Mikroorganismen somit den Weg ²⁶. Im ersten Teil dieser Studie wurden die Rahmenbedingungen für die konkrete Anwendung *A. borkumensis* als Komponente einer biologischen Reinigungsmethode verwendet. In einem zweiten Schritt sollte im Rahmen einer Mesokosmenstudie ein Prototyp einer solchen Anwendung erdacht werden.

Ölbindemittel als physikalische und biotechnologischer Bestandteil von Reinigungsmethoden

Kernstück und Basistechnologie aller oben gezeigten Versuche stellte das Ölbindemittel X-Oil dar. Wie bereits erwähnt handelt es sich dabei um ein auf Textilfasern basierendes Granulat, das etwa das Fünffache seines Eigengewichtes an Öl aufzunehmen mag. Dabei legt sich wie in Abb. 3.2c sichtbar eine dünne Schicht Öl um die einzelnen Fasern des Ölbindemittels. Da es durch die Vielzahl der Textilfasern über eine enorm große Oberfläche verfügt, bindet X-Oil eine ungewöhnlich große Menge Öl. Die Bindung des Öls erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Textilfasern, die zu einem großen Teil Leder enthalten. In der Tat sind in der Wirtschaft unzählige verschiedene Produkte zur Bindung von Schweröl gebräuchlich: Sehr verbreitet sind mineralische Ölbindemittel, die beispielsweise in Kfz-Werkstätten oder von Feuerwehr und Straßenmeistereien zur Bindung von Diesel und Motorölen verwendet werden. Hierbei wird das Öl durch Kapillarkräfte in poröse Mineralien gesogen. Ein Nachteil der Mineralien ist eine hohe Toxizität durch die Bindung des Öls. Für die verschiedensten Anwendungen sind Ölbindemittel aus Kunststoffen verfügbar: So bietet eine ganze Reihe von Anbietern Fasermaterialien oder Schaumstoffe aus Polyethylen, Polypropylen und Polyurethan an, die durch hydrophobe Wechselwirkungen das Öl binden sollen ²². Neben diesen industriellen Lösungen der Problematik sind auch biologische Lösungsansätze vorhanden: So wird beispielsweise getrockneter Torf für die Bindung des Öls angeboten. Ein interessanter Ansatz wurde durch Pasila sowie Suni et al. vertreten: In zwei Studien wurden Stroh von finnischen Gräsern, Hanffasern sowie Flachs mit großem Erfolg für die Bindung von Öl eingesetzt ^{20, 21}. Pflanzliche Fasern sind jedoch für den Einsatz im Meer ungeeignet, da Meerwasser eine hohe cellulolytische Aktivität aufweist und dieses Fasermaterial zersetzt wird, was möglicherweise Rückstände des Öl bei längerer Verweildauer im Meer wieder freisetzen würde.

Der Kerngedanke der hier präsentierten Reinigungsstrategie ist die Vermeidung einer der größten Umweltgefahren, die von auslaufendem Öl – insbesondere von Schwerölen wie Bunker C – ausgehen. Bunker C nimmt nach dem Auslaufen eine relativ große Menge an Wasser auf ^{1, 7, 66}. Durch diese Aufnahme bildet sich eine Wasser-in-Öl-Emulsion, die in Form einer zähflüssigen Masse („chocolate mousse“) verdriftet wird. Im ungünstigsten Fall erhöht sich die Dichte der Emulsion infolge der Wasseraufnahme, so dass die Chocolate Mousse zum Meeresboden sinkt, wo sie nicht weiter abgebaut wird und das Sediment zerstört ¹⁶.

Erhöhung der Bioverfügbarkeit des gebundenen Öls

Eine weitere Gefahr geht von der Toxizität der einzelnen Öle aus: Während Diesel, Kerosin und raffinierte Leichtöle, die in der Regel für Studien zum Ölabbau verwendet werden, zum größten Teil aus Kohlenwasserstoffen bestehen, enthalten die Öle, die statistisch gesehen am häufigsten ins Meer gelangen – Bunker C, mittelschweres Gasöl (marine fuel oil) sowie Rohöl – eine Zahl weiterer Verbindungen, die zum Teil hochgiftig sind, wie zum Beispiel Schwermetalle wie Cadmium und Blei, circa 2,5% (w/w) Schwefel, sowie schwer abbaubare halogenierte Kohlenwasserstoffe ^{1, 66}. Neben diesen giftigen Substanzen enthalten insbesondere Schweröle etwa 5% (w/w) an so genannten Asphaltenen – langkettigen Kohlenwasserstoffen, die sich in ihren chemischen Eigenschaften wie Parafin, Bitumen oder Teer verhalten und sich durch diese dem Ölabbau durch Bakterien entziehen ⁶⁶. Eine Freisetzung dieser Stoffe in der Wassersäule ist auf jeden Fall zu vermeiden, da diese Gifte im schlimmsten Fall in die Nahrungsketten des Meeres gelangen, sich dort anreichern und in Form von Fischprodukten in die Nahrung des Menschen geraten. Dies ist insbesondere in Küsten- und Flussmündungsbereichen, in denen intensive Fischerei betrieben wird, zu bedenken ^{1, 16}.

In den bisherigen Bekämpfungsmethoden von Ölverschmutzungen ist hierbei der Einsatz von Dispergatoren – hochwirksamen, aber z.T. giftigen chemischen Tensiden – vorgesehen ^{1, 7, 16}. In einer Studie ist darüber hinaus der Einsatz von Biotensiden beschrieben und als hochwirksam empfohlen worden ¹⁰⁶. Im Falle beider Methoden wird bei der Anwendung ausgetretenes Öl im Meerwasser fein verteilt, bevor Bakterien vorhanden sind, die Öl und Schadstoffe abbauen oder immobilisieren. In der Folge steigt die Toxizität des Meerwassers stark an, und die oben beschriebenen Giftstoffe werden mobilisiert ¹⁶. Eine solche Entwicklung ist aus den oben genannten Gründen in jedem Fall zu vermeiden.

Die unter 4.3 beschriebene Anwendung beschreibt ein komplett gegensätzliches Konzept: Öl soll zunächst an Ölbindemittel gebunden und immobilisiert werden, die Gesamtheit der Schadstoffe wird dabei aus dem Meerwasser entfernt. Diese Bindung des Öls erfolgt wie sowohl in der Mikrokosmen- als auch in der Mesokosmenstudie binnen weniger Stunden oder Tage. In einem zweiten Schritt wird durch Bestandteile der Anwendung das Wachstum ölabbauender Bakterien möglichst optimal angeregt. Diese Mikroorganismen setzen den biologisch verwertbaren Teil des Öls in Biomasse und Kohlendioxid um. Asphaltene, Schwefel und Schwermetalle bleiben in Form eines Rückstandes im Ölbindemittel zurück. Durch den biologischen Abbau eines großen Teils der Kohlenwasserstoffe ist das Ölbindemittel mehrfach verwendbar, bevor es in einem letzten Schritt als Sondermüll deponiert oder verbrannt werden kann.

Verwendung von Düngemitteln und Effizienz von Biostimulation

Wie in vielen Studien ^{23, 32, 102} und auch im Rahmen der oben präsentierten Mikrokosmenstudie festgestellt erfordert Biodegradation eine massive Zufuhr von Nährstoffen. Hierbei müssen drei wesentliche Probleme der Nährstoffzufuhr gelöst werden: Zum einen muss ein optimales Verhältnis der Nährstoffe vorliegen sowie Spurenelemente vorhanden sein. In ungünstigen Fällen kann ein Dünger zwar große Mengen Stickstoff und Phosphate enthalten, ein Wachstum aber dennoch begrenzt werden, da Spurenelemente wie Kalium, Eisen, Molybdän limitierend werden ³². Zum zweiten muss eine Versorgung mit Nährstoffen über einen langen Zeitraum – in der Regel mehrere Monate – gewährleistet sein. Ein dritter Faktor ist die Verfügbarkeit des Düngers im Bereich des Öls.

In einer ganzen Reihe von Versuchen und Feldstudien wurde eine Vielzahl von verschiedenen Düngemitteln verwendet. So wurden bereits durch Gunkel im Rahmen einer auf Kultivierungsmethoden basierenden Studie zum Ölabbau in der Nordsee optimierte Lösungen anorganischer Dünger entwickelt, die auch in der Mikrokosmenstudie zum Einsatz kamen ⁷⁰. Da die Lösungen jedoch wasserlöslich waren und ausserdem kontinuierlich in die Wassersäule gegeben werden musste, ist ein Einsatz solcher Lösungen im Meer unzweckmässig. Für die Verwendung in Feldstudien wurde daher eine Zahl von Langzeitdünger verwendet, die sich erst nach und nach in der Wassersäule lösen. Ein gutes Beispiel hierfür ist der für den Abbau von Rohöl nach der „Exxon Valdez“-Havarie verwendete Dünger Inipol EAP 22. Es handelt sich dabei um eine von Elf Aquitaine hergestellte Mischung aus Harnstoffformaldehyd und Butoxyethanol eingekapselt in Oleinsäure und Laurylsulfat, deren genaues Mischverhältnis ein Betriebsgeheimnis ist ^{39, 41}. Insbesondere die Verwendung von Harnstoffformaldehyd führte jedoch zu einer relativ hohen Toxizität dieses Düngers. Swannell et al. berichten von der Verwendung von bis zu 10% (w/w) Inipol EAP 22 pro Ölgewicht, wobei eine größere Menge Inipol zu besseren Ergebnissen führte; in einigen Fällen wurde jedoch berichtet, dass Inipol in regelmässigen Zuständen, bis zu 48h, zugegeben werden musste ³⁹. Neben Inipol EAP 22 wurden in verschiedenen Studien auch andere Düngergemische unterschiedlichster Anbieter, in Einzelfällen auch organische Produkte wie zum Beispiel Fisch- oder Fleischmehl verwendet ^{25, 41}.

Ein relativ effektiver Industriedünger – Customblen – besteht aus den Salzen Ammoniumnitrat, Calciumphosphat und Ammoniumphosphat. In der Tat findet diese Zusammensetzungen von Salzen auch in neuartigen Industriedüngern Verwendung ³⁹. Xu et al. beschreiben ein Experiment zum Ölabbau in Mesokosmen von Strandsand. Dabei wurde der Dünger Osmocote (Scotts) verwendet. Dieser mit einer quellfähigen Membran umgebene Dünger, der dieselben Salze wie Customblen nutzt, setzt in gleichmässiger Rate Ammonium-, Calcium-, Nitrat- und Phosphationen frei. Dadurch besitzt der Dünger eine relativ geringe Toxizität. Aufgrund dieser nahe liegenden Eigenschaften wurde Osmocote für den oben beschriebenen Prototyp eingesetzt ⁴⁶.

Ein letzter Faktor, der ausgehend von den Ergebnissen der Mesokosmenstudie umgesetzt werden sollte, war die experimentelle Untersuchung einer Bioaugmentationmethode mit *Alcanivorax borkumensis*. In der Fachliteratur sind im Zusammenhang mit der Bioaugmentation drei wesentliche Techniken verwendet worden: Die Zugabe von Biomasse in Form von Laborkulturen, die Zugabe von gefriergetrockneter Biomasse sowie die Zugabe in Kapseln eingeschlossener Bakterienzellen ^{47, 107}. Da Vorversuche mit gefriergetrockneter Biomasse von *A. borkumensis* äusserst unzufriedenstellende Ergebnisse zeigten und eine Verkapselung von Biomasse aufgrund der hohen Produktionskosten

impraktikabel für eine Reinigungsstrategie waren, wurde eine Züchtung und Zufuhr von Biomasse für diese angewandt. Hierbei wurden die besonderen Eigenschaften der Biofilmbildung von *A. borkumensis* auf der Oberfläche des Bindemittels genutzt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Immobilisierung der Biomasse durch die Bakterien auf dem Ölbindemittel, das zuvor mit Öl behandelt wurde in Form eines robusten Biofilms. Wie in allen drei Studien gezeigt, wird ein gewisser Teil des Biofilms mit der Zeit vom Ölbindemittel abgelöst, was im Falle der Reinigungsmethode für eine Freisetzung der Bakterien sorgt.

4.3 Mesokosmenstudie: Effizienz einer experimentellen Reinigungsmethode

Um die einzelnen oben aufgeführten Komponenten in einer sinnvollen Anwendung zu vereinigen, wurden für den Prototypen der Reinigungsstrategie zwei Formen gewählt: Eine Schwimmbarriere in Schlauch- sowie in Mattenform. Schwimmbarrieren sind eine der gebräuchlichsten Formen von mechanischen Hilfsmitteln zur Vermeidung von Ölverschmutzungen im Meer. In der Regel bestehen diese aus einer dünnen Schicht robusten Kunststoffs oder Schaumstoffwülsten, die um Ölteppiche herum ausgelegt werden um eine Ausbreitung von Öl im Meer zu vermeiden. Sie können alternativ als Prävention vor Verschmutzung um bunkernde Schiffe oder sensible Bereiche gespannt werden ¹. Schwimmmatten hingegen könnten zur Absorption des Öls direkt auf Ölteppiche gegeben werden. Für den Erfolg dieser Anwendung sind sowohl technische als auch biotechnologische Kriterien ausschlaggebend: So muss die Anwendung mechanisch belastbar, seewasserbeständig, schwimmfähig und selbst im Meerwasser saugfähig für Öl sein. Biotechnologische Kriterien sind der Bewuchs mit ölabbauenden Bakterien, eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie ein nachweislicher Abbau der gebundenen Kohlenwasserstoffe.

Mechanische und physikalische Eigenschaften der Schwimmkörper

In der Tat erfüllte sowohl die im Mesokosmenbecken I eingesetzte Schwimmbarriere als auch die Schwimmmatten im Mesokosmenbecken II vollständig die technischen Vorgaben: Beide Konzepte waren bis zum Versuchsende mechanisch stabil und schwimmfähig, was auf die Zugabe von Schwimmkörpern zurückzuführen ist. Ebenso wurde ein Großteil des zugegebenen Schweröls entfernt, wobei der größte Teil sofort gebunden wurde, ein kleiner Rest als Ölteppich innerhalb der durch die Barriere abgegrenzten Zone vorlag, wie in Abb. 3.10a zu erkennen ist. Diese Menge an Öl wurde jedoch bis zum Ende des Versuches reduziert, was auf die langsame Bindung an die Barriere, Emulsionsbildung oder Absinken des Schweröls zurückzuführen ist. Da jedoch bei der Reinigung des Beckens nur geringe Rückstände gefunden wurden, sind die beiden erstgenannten Prozesse für das Verschwinden der Ölrückstände verantwortlich. Im Falle der Schwimmmatten ist in Abb. 3.10b die hellbraune Farbe des Hüllmaterials zu erkennen. In diesem Becken lagen deutlich geringere Mengen an emulgiertem Öl vor als in Mesokosmos II. Bei der Reinigung dieses Beckens wurden an der Unterseite der Schwimmmatten schwarze Verfärbungen durch das Öl festgestellt. Dies zeigt die starke Aufnahme von Öl durch dieses Material im Seewasser. Bei der genaueren Betrachtung der Schwimmbarriere nach dem Ende des Versuches zeigte sich, dass insbesondere das Hüllmaterial aus Polypropylen Öl absorbiert hatte und dieses erst nach der Sättigung des Hüllmaterials ins Innere der Barriere vordrang. Ein Vorteil dieser Kombination ist jedoch, dass selbst geringfügige Verschmutzungen wie fein emulgiertes Öl aufgenommen werden. Zwei Nachteile des Ölbindemittels

X-Oil wurden anhand des Mesokosmenversuches deutlich: So nimmt dieses Bindemittel eine nicht geringe Menge Wasser auf, wodurch sich das Gewicht der Barriere erhöht und diese schwerer zu handhaben ist. Ferner gibt wie bereits erwähnt X-Oil Farbstoffe des Ausgangsmaterials ab. Dennoch ist vom technischen und mechanischen Standpunkt die hier gezeigte Anwendung des Ölbindemittel äusserst sinnvoll, da das Öl hiermit eingedämmt und zu einem großen Teil sofort gebunden werden kann. Schwimmmatten können auf die Oberfläche von ausgelaufenem Öl gegeben werden, um Rückstände zu binden. Die hohe Affinität des Hüllmaterials zum Öl dient ferner der gründlichen Reinigung geringfügiger Verschmutzungen.

In allen drei in dieser Arbeit präsentierten Studien wurden mit dem Ölbindemittel X-Oil gearbeitet, wobei jeweils eine Emulsionsbildung des Schweröls zu beobachten war, welches zuvor an X-Oil gebunden war. Erst in den weiter unten präsentierten Predationsmikrokosmen wurde zusätzlich ein auf Polypropylen basierendes Material – SuperM – eingesetzt, bei dem eine Emulsionsbildung weitestgehend ausblieb, wie in Abb. 3.24 deutlich zu erkennen ist. Dieser Unterschied ist offensichtlich materialbedingt; so zeigt beispielsweise SuperM, ein oberflächenbehandeltes Polypropylenfasermaterial, eine um 400% höhere Affinität zu X-Oil. Es besteht somit die Möglichkeit, dass Biofilm und Schweröl in Folge der Aktivität ölabbauender Bakterien durch Biotenside von der Oberfläche des X-Oil abgelöst werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Biofilme auf SuperM nur geringe Schichtdicken erreichen und sich daher weniger empfindlich für mechanische Belastungen und Scherkräfte sind.

Eine Bewertung der Emulsionsbildung in Anwesenheit des Ölbindemittels ist schwierig: Auf der einen Seite besteht hier wie im Falle der von McKew et al. vorgeschlagenen Zugabe von Biotensiden die Gefahr der Mobilisierung giftiger Bestandteile des Öls in der Wassersäule¹⁰⁶. Auf der anderen Seite wird durch die Emulsionsbildung nicht nur die Bioverfügbarkeit des Öls erhöht, was dessen Abbau extrem beschleunigt, sondern auch die Biomasse von hydrocarbonoclastischen Bakterien in der Wassersäule fein verteilt, wodurch eine Besiedlung weiterer ölverschmutzter Bereiche ermöglicht wird. Eine positive oder negative Bewertung hängt daher mit der Toxizität des ausgetretenen Öls zusammen: im Falle eines Öls, welches größtenteils aus Kohlenwasserstoffen besteht und wenige toxische Komponenten enthält überwiegt der Vorteil durch die Emulgation, im Falle von Bunker C oder schweren Rohölen ist eine Bindung des Öls vorzuziehen. Hierzu könnten jedoch Anwendungen entwickelt werden, die verschiedene Bindemittel einsetzen, um den jeweiligen Ansprüchen gerecht zu werden.

Neben dieser technischen Betrachtung zeigten die vorliegenden Anwendungen auch biotechnologische Verwendungsmöglichkeiten. Von elementarer Bedeutung war hierbei der Bewuchs des gebundenen Öls durch ölabbauende Bakterien sowie deren Aktivität. Diese wurde bereits im Falle der Mikrokosmenstudie beobachtet und ist ebenso in der Abb. 3.12 dargestellt. Es zeigen sich sogar Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaften, auf die im Zusammenhang mit der mikrobiellen Ökologie dieses Prozesses eingegangen wird. Bereits die Ergebnisse der Mikrokosmenstudie bestätigten, dass X-Oil trotz der Abgabe von Chemikalien wie Farbstoffen keine negativen Auswirkungen auf die ölabbauenden Bakterien hat, sondern prinzipiell eine Besiedlung ermöglicht. Wie in Abb. 3.20 b sichtbar war im Falle der Mesokosmenstudie sogar ab dem Versuchstag 3 A. *borkumensis* in den Proben des X-Oils nachweisbar, was auf die Anwendung von Biomasse dieses

Organismus zur Bioaugmentation zurückzuführen ist. In der Tat ist selbst am Versuchstag 0 eine schwache Bande dieses Bakteriums erkennbar.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die auf der Oberfläche des Ölbindemittels vorhandenen Bakterien eine Aktivität zeigen. Hierfür sind zwei Indizien vorhanden: So konnte zumindest für einen Versuchszeitpunkt RNA von *A. borkumensis* auf der Oberfläche des X-Oils nachgewiesen werden. Ferner sind deutliche Verschiebungen der mikrobiellen Gemeinschaften anhand der Bandenmuster in Abb. 3.20 b zu erkennen, was eine mikrobielle Aktivität erfordert.

Sauerstoffversorgung der Schwimmkörper

Einen weiteren Hinweis auf diesen entscheidenden Faktor für diese Anwendung gibt die Messung der Sauerstoffkonzentration in den Schwimmbarrieren wieder, deren Ergebnisse in Abb. 3.11a gezeigt werden: Es ist deutlich eine Abnahme des gelösten Sauerstoffs zu beobachten, was auf mikrobielle Aktivität zurückzuführen ist. So enthielten die Schwimmbarrieren nach zehn Versuchstagen nur noch etwa 50% der Sauerstoffkonzentration des umgebenden Mesokosmenwassers, nach weiteren 18 Tagen wurden Konzentrationen von weniger als einem mg/l gelösten Sauerstoffs gemessen. Dies zeigt gleichzeitig einen Schwachpunkt des hier gezeigten Systems auf: Trotz des mit 18 cm relativ gering gewählten Durchmessers findet kein ausreichender Gasaustausch des Mediums in den Barrieren mit dem umgebenden Meerwasser statt. Erstaunlicherweise sinkt die Sauerstoffkonzentration aber langsam und kontinuierlich, so dass der Sauerstoff in den Barrieren erst nach etwa 28 Tagen verbraucht wird. Wie in der Mikrokosmenstudie gezeigt wurde, sind jedoch selbst bei Temperaturen um 20°C bis zu 40 Tage nötig um Bunker C - Schweröl auf aerobem Wege weitestgehend abzubauen. Gründe für diese geringfügige Versorgung mit Sauerstoff können entweder in der Beschaffenheit des Hüllstoffes sowie des Bindemittels X-Oil liegen oder aber in der starken Aktivität der ölabbauenden Bakterien. Bei dem verwendeten Hüllstoff handelte es sich um ein dreilagiges Polypropylen Gewebe mit einem Porendurchmesser von etwa 5 µm. Durch Verwendung eines dünneren Gewebes mit größeren Poren könnte die Durchmischung des Wassers in der Barriere mit dem umgebenden Meerwasser gesteigert werden, wobei jedoch die mechanische Belastbarkeit gesenkt wird. Ein weniger leicht zu beeinflussender Faktor ist die Beschaffenheit des mit Öl verschmutzten X-Oils: Im Falle einer sehr starken Verschmutzung mit Öl haften die einzelnen Fasern des Ölbindemittels zusammen und werden durch das Öl zu einer dichten Masse verbunden. In diesem Fall ist eine Zufuhr mit Sauerstoff durch Diffusion nicht mehr möglich. Es müssen Modifikationen am Ölbindemittel erfolgen oder dieses durch ein besser geeignetes Bindemittel ersetzt werden. Eine weitere mögliche Modifikation wäre die Herstellung dünnerer Barrieren, die in Bündeln zu einer großen Barriere verbunden werden.

Durch eine Reduktion des Durchmessers der Barrieren könnte die Versorgung des Ölbindemittels durch Diffusion erheblich verbessert werden. Neben diesen Veränderungen wäre auch eine technische Modifikation der Barrieren denkbar: So könnte mittels elektrischer Pumpen Luftsauerstoff in die Barrieren geleitet werden. Eine solche Modifikation wäre vor allem in stationären Barrieren in Häfen, in denen punktuell und regelmäßig starke Ölverschmutzungen auftreten, zum Beispiel an Ölterminals oder Werften, denkbar und würde ferner eine Verwendung von Barrieren mit großem Durchmesser erlauben.

Ein interessanter Ansatz zur Lösung dieser Problematik bietet sich auf chemischem Wege über eine Modifikation des Langzeitdüngers. In der Landwirtschaft stellen Staunässe und dadurch anaerobe Böden ein großes Problem dar: So werden nicht nur durch Denitrifikation große Teile des eingebrachten Düngers durch Bakterien zu Stickstoff umgesetzt und gehen durch Diffusion verloren, sondern es kommt ferner zu Schäden an Pflanzenwurzeln¹¹². In diesem Zusammenhang empfiehlt eine Studie die Verwendung eines Düngers, der auf chemischen Wege Sauerstoff in den Boden einbringen kann. Dieser Dünger basiert auf dem Einsatz von Peroxiden, starken Oxidationsmitteln, die industriell als Bleichmittel oder zur CO₂-Absorption auf Unterseebooten bzw. in Atemschutzgeräten verwendet werden. Für solche Dünger wird insbesondere Kaliumperoxid (KO₂) eingesetzt, das nach Zugabe in den Boden und Kontakt mit Wasser zu Kaliumionen und elementarem Sauerstoff reagiert. Ferner reagiert Kohlendioxid in Anwesenheit von Peroxiden unter Sauerstoffabgabe zu Carbonaten. Auf diese Weise wird der Sauerstoff in gebundener Form in den Boden eingebracht und steht beim Auftritt von Staunässe zur Verfügung. Im hier gezeigten Fall kann durch eine einfache Modifikation des Langzeitdüngers eine ähnliche chemische Zufuhr von Sauerstoff erreicht werden¹¹².

Nährstoffversorgung der Schwimmkörper

Der für die Barrieren und Matten verwendete Osmocote Pro – Dünger®, der auch in Studien von Xu et al. zur Anwendung kam, ist ein industrielles Massenprodukt, das ursprünglich für die langfristige und kontinuierliche Düngung von Rasenflächen verwendet wird⁴⁶. Die Zusammensetzung des Düngers aus Ammoniumnitrat, Calciumphosphat und Ammoniumphosphat ähnelt jedoch dem häufig für die Biostimulation eingesetzten Dünger Customblen®³⁹. Hierdurch ergibt sich eine für ölabbauende Bakterien nahezu optimale Kombination von Stickstoff- und Phosphatquellen, die in diesem Versuch noch durch Spurenelemente wie Eisen, Kalium und Molybdän ergänzt wurde. Im Gegensatz zu den Versuchen von Xu et al., die sich auf Mesokosmen mit Strandsand, die sich im Wesentlichen wie Sedimente oder Böden verhalten, lag in dieser Studie ein Mesokosmos in einer Wassersäule vor, für den keine Referenzwerte vorlagen. Zwar liegen in den Barrieren und Schwimmatten Bedingungen vor, die eine Ähnlichkeit mit dem Boden aufweisen, aber parallel hierzu enthielt jedes Mesokosmenbecken ein Wasservolumen von 500 l mit völlig anderen Parametern. Vorversuche mit Osmocote in Mikrokosmen haben gezeigt, dass ein Verhältnis von Düngermasse zu gebundenem Öl von mindestens 1:2 vorliegen muss, um eine schnelle Emulsionsbildung einzuleiten. Diese große Menge an Dünger ist nötig, da ein gewisser Teil der Düngermasse auf die speziellen Membranen entfällt und der Dünger nur langsam abgegeben wird. Unter dem Gesichtspunkt, dass ein Teil des Düngers möglicherweise in den Barrieren von Schweröl umschlossen und somit unwirksam wird, ferner eine realistische Anwendung im Meer einer kontinuierlichen Verdünnung des Düngers ausgesetzt ist, wurden 3,5 kg Dünger in der Schwimmbarriere eingesetzt. Dies führte zu einer erheblichen Eutrophierung der Mesokosmen.

Wie unter 3.13 a und b erkennbar, lagen zum Teil Konzentrationen von bis 20 mM Ammonium und 10 mM Nitrat in beiden Mesokosmen vor. Dies übertrifft die Konzentrationen an Stickstoff des für die Mikrokosmenstudie verwendeten Kulturmediums nach Gunkel, welches 9,35 mM Ammonium enthält. Somit waren weder Stickstoff noch Phosphat während des Versuches limitierend für das Wachstum der Bakterien, es traten jedoch einige negative Effekte auf: so kam es infolge einer hohen mikrobiellen Aktivität in den Mesokosmen offensichtlich zu Denitrifikationsprozessen, in deren Verlauf sich bis zu 600 μM des hochgiftigen und hochreaktiven Nitrits in beiden Becken bildeten. Ein weiterer äusserst negativer Effekt war die Bildung von Ammoniak infolge der Eutrophierung mit Ammoniumsalzen. Wie in Abb. 3.14 a und b erkennbar verschob sich der pH-Wert in beiden Mesokosmen auf Werte von über 8, was zu einer Verschiebung des chemischen Gleichgewichtes von Ammonium und Ammoniak zugunsten der letzteren toxischen Verbindung führte.

Diese Beobachtungen deuten an, dass die Dosierung des verwendeten Düngers von erheblicher Wichtigkeit ist, wobei ein Kompromiss zwischen Eutrophierung und ausreichender Versorgung mit Nährstoffen zu suchen ist. In diesem Zusammenhang müssen jedoch weitere Versuchsreihen in einem größeren Volumen an Meerwasser erfolgen, da der Verdünnungseffekt des Düngers im Wasser bzw. die lokalen Konzentrationen des Düngers im Umfeld der Schwimmbarrieren und Matten in den verwendeten Mesokosmen nicht simulieren lassen.

Eine Alternative zu den hier verwendeten Düngern wurde in einer Reihe von Studien durch Rosenberg et al. aufgezeigt: Hierbei wurden Överschmutzungen im Süßwasser mit einer Reihe von Düngern verwendet, die auf Guano bzw. Harnsäure basieren. Diese Stoffe sind stark hydrophob, haften auf der Oberfläche des Öls und sind darüber hinaus für eine Vielzahl von hydrocarbonoclastischen Bakterien als Stickstoffquelle verwendbar^{113, 114}. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit wird eine Ausschwemmung und damit verbundene Eutrophierung vermieden, was zu einer höheren Effizienz dieser Dünger führt. Ein Einsatz dieser Dünger in Verbindung mit der hier gezeigten Anwendung ist daher ratsam und sollte in einer weiterführenden Studie erfolgen.

Neben den oben gezeigten negativen Eigenschaften zeigt die Eutrophierung jedoch einen positiven Nebeneffekt, der das oben beschriebene Problem der schwachen Versorgung mit Sauerstoff kompensiert: So konnten anhand der Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften eine Zahl an Organismen nachgewiesen werden, die mit Bakterien, die zur Denitrifikation fähig sind, in einem engen Verwandtschaftsverhältnis stehen. Das im Mikrokosmos vorhandene Nitrat kann von solchen Organismen als alternativer Elektronenendakzeptor verwendet werden und somit das Wachstum von Mikroorganismen in Bereichen, in denen Sauerstoff limitierend wird, zum Beispiel innerhalb der Schwimmbarrieren und -matten unterstützen^{115, 116}.

Um eine Eutrophierung mit Stickstoffverbindungen in zukünftigen Studien oder Anwendungen zu vermeiden müssen die Abgaberaten des Düngers sowie die Verbrauchsraten der Stickstoffverbindungen aneinander angeglichen werden. Obwohl hierzu bereits Modelle wie die Resource-Ratio-Theorie entwickelt werden, sind für reale Einsätze der hier gezeigten Methode weder Berechnungsformeln noch Erfahrungswerte vorhanden, jedoch können anhand der Abgaberate und der maximalen Kapazität für Öl der verwendeten Menge an Ölbindemittel die maximal für den Ölabbau notwendige Menge Dünger abgeschätzt werden. Durch eine solche Anpassung können gravierende Eutrophierungen vermieden werden.

Zugabe bakterieller Biomasse in die Schwimmkörper

Ein letzter Punkt, der eine Bedeutung für die Effizienz und Funktionsweise der oben beschriebenen Anwendung hat, ist der Versuch der Bioaugmentation durch *A. borkumensis*. Wie bereits erwähnt wurde lebende Biomasse dieses Organismus in Form von auf X-Oil immobilisierten Biofilmen dem X-Oil in der Schwimmbarriere beigegeben. Da kein Referenzmesokosmos mit einer Barriere ohne diese Zugabe aufgebaut werden konnte, ist eine klare Aussage über die Wirkung dieser Bioaugmentation nicht möglich. Eine leichte Tendenz, dass die Bioaugmentation Auswirkungen auf die Effizienz dieses Prototyps hat, ist anhand der Abbildung 3.19 b zu erkennen. Hier kann eine schwache Bande von *A. borkumensis* bereits zu Versuchsbeginn gesehen werden, die an den folgenden Versuchstagen an Intensität gewinnt und im weiteren Verlauf sichtbar ist.

Neben dem Nachweis der Wirkungsweise der Bioaugmentation ist auch die großtechnische Umsetzung dieser Methode ein Problem. Dabei ist vor allem die Wahl der Organismen, die Methode der Anzucht der Biomasse sowie die Konservierungs- und Lagerungsmethode von Bedeutung. Die Konservierung von Biomasse ist dabei elementar wichtig, da ein Vorrat geeigneter Biomasse eine schnellere Reaktion auf plötzlich auftretende Ölverschmutzungen erlaubt. Da eine Lagerung und der Versand von lebender Biomasse auf Ölbindemitteln schwer umzusetzen ist, wurden in einer weiteren Versuchsreihe ölabbauende Bakterien sowie Konsortien gezüchtet und unter Verwendung des Schutzmittels Dimethylsulfoxid eingefroren. Der Versuch zeigt, dass sowohl die Biomasse von *A. borkumensis* als auch von Konsortien nicht nur den Gefrierprozess überleben, sondern auch mindestens drei Monate nach dem Gefrieren rekultivierbar sind, wobei jedoch sowohl die Menge der rekultivierbaren Zellen pro Gramm Ölbindemittel mit steigender Lagerungsdauer um den Faktor 1000 sinkt. Erstaunlicherweise zeigten jedoch nur die konservierten Konsortien nach zwei Monaten eine Fähigkeit zur Emulsionsbildung. Dieses Ergebnis deutet an, dass eine Lagerung von Biomasse mit der hier gezeigten Methode prinzipiell möglich ist, diese jedoch verfeinert werden muss, um längere Lagerzeiten und bessere Rekultivierungseffizienzen zu erreichen. Eine preisgünstige Alternative für diese Methode könnten Verkapselungstechniken bieten, die ebenso einfach umsetzbar wie das Gefrieren der Zellen ist. Hierbei wird lebende Biomasse in Alginat oder Agar eingeschlossen und gekühlt gelagert. Bei Anwendung in einer wässrigen Lösung quellen Alginat bzw. Agar auf und die Biomasse wird freigesetzt. Da in Meerwasser Bakterien vorhanden sind, die Polymere wie Agar aufspalten können, bietet sich diese Methode zur weiteren Überprüfung an. Eine zweite Alternative bietet die Anzucht von Biomasse auf Chitin oder Chitosan. Dieses von Insekten und Krebstieren produzierte Polysaccharid bietet eine hervorragende Matrix für das Wachstum von Biofilmen⁴⁶.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass durch Kombination verschiedener biotechnologischer, physikalischer und technischer Lösungsansätze eine Lösung des Problems Ölverschmutzung im Meer nicht nur prinzipiell möglich ist sondern auch mit einfachsten und kostengünstigen Mitteln umzusetzen ist.

Obwohl die hier gezeigten Prototypen keine optimalen Resultate lieferten und in Hinblick auf Sauerstoffversorgung, Bioaugmentation und Eutrophierung durch Nährstoffe sicherlich noch Bedarf für Nachbesserungen besteht, konnte das in der Mesokosmenstudie gesetzte Ziel, 2,5 l Schweröl aus der Wassersäule von 500 l Meerwasser so weit zu entfernen, dass der gesetzliche Grenzwert von 9 mg Öl pro Liter Meerwasser eingehalten werden konnte, vollständig erreicht werden. Dies zeigt, dass trotz aller Probleme die hier verwendete Methode von ÖladSORPTION und Bioremediation der richtige Weg hin zu einer umweltfreundlichen Bekämpfung von Ölverschmutzungen im Meer ist. Es ist festzuhalten, dass für alle aufgetretenen Probleme nicht nur Erklärungsansätze sondern viel mehr auch Lösungsvorschläge vorliegen, die eine Umsetzung und weitere Verfolgung der hier gezeigten Strategie dringend erforderlich machen.

4.4 Ökologie des marinen biologischen Ölabbau

Neben der Lösung des biotechnologischen Problems des Ölabbau befasste sich der zweite Themenkomplex dieser Arbeit mit der Zusammensetzung der Konsortien, die bei der Biodegradation des Bunker C – Schweröls kooperieren sowie mit ihrer Interaktion mit natürlicherweise im Meer vorkommenden Prokaryoten und Eukaryoten.

Hierbei muss zunächst berücksichtigt werden, dass das Austreten von Öl einen gravierenden Eingriff in das Ökosystem darstellt: Meerwasser enthält mit Ausnahme einiger Randmeere und Flussmündungen in der Regel sehr wenige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatquellen. Die in der Wassersäule vorhandenen Mikroorganismen sind meist an diese nährstoffarmen Bedingungen angepasst und können entweder ohne starke Stoffwechselaktivität lange Zeiträume überdauern oder weisen nur minimale metabolische Aktivität auf ^{29, 47, 95}.

Der Austritt von Öl im Meer führt zu einem plötzlichen Auftreten einer sehr energiereichen Verbindung, die jedoch einer ganzen Zahl von chemischen und physikalischen Veränderungen unterliegt: So treten Kohlenwasserstoffe mit bis zu 16 Kohlenstoffatomen aufgrund ihrer niedrigen Siedepunkte relativ einfach in die Atmosphäre über. Im Falle von Diesel, der im Wesentlichen aus Hexan, Heptan, und Octan besteht, verdunsten so bereits nach wenigen Tagen mehr als 90% der Kohlenwasserstoffe. Treten hingegen Schweröle ins Meerwasser aus, so führt die Bildung einer Wasser-in-Öl-Emulsion zum Absinken des Öls zum Meeresgrund, an dem aufgrund niedriger Temperatur und Sauerstoffkonzentrationen ein Abbau schwer möglich ist ^{1, 7, 16, 66}. Um von der Kohlenstoff- und Energiequelle Öl profitieren zu können, müssen Bakterien diese also sehr schnell nach ihrem Auftreten erschliessen können. Hierbei bestehen jedoch zwei weitere Probleme: Während Sauerstoff zur Oxidation des Öls im Meerwasser in ausreichender Menge vorhanden ist, enthält es meist nur Spuren von Nährstoffen, die zur Teilung und zum Aufbau von Biomasse benötigt werden. Ferner bildet Öl durch seine chemischen Eigenschaften eine Grenzfläche mit dem Meerwasser. Zur Erschliessung des Öls muss diese Grenzfläche besiedelt werden können. Hierbei ist besonders ein Schutz der Zellmembranen, die durch das Öl geschädigt werden könnten, nötig.

Somit stellt Öl im Meer eine ganze Zahl an Ansprüchen an Bakterien, die dieses verwerten können: Schnelles Wachstum, überlegene Aufnahmefähigkeiten von Nährstoffen sowie die Fähigkeit zur Besiedlung des Öls. In der Tat werden diese Fähigkeiten in der Gruppe der hydrocarbonoclastischen Bakterien (HCB) angetroffen. Hierbei haben eine ganze Zahl von Bakteriengattungen diese Fähigkeiten entwickelt ^{27, 58}.

Microorganisms that aerobically degrade aliphatic hydrocarbons

Bacteria	Yeasts	Fungi	Algae
<i>Achromobacter</i>	<i>Candida</i> (+)	<i>Aspergillus</i>	<i>Prototheca</i>
<i>Acinetobacter</i> (+)	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cladosporium</i>	
<i>Alcanivorax</i> (+)	<i>Debaryomyces</i> (+)	<i>Corollasporium</i>	
<i>Alcaligenes</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Cunninghamella</i>	
<i>Bacillus</i>	<i>Pichia</i>	<i>Dendryphiella</i>	
<i>Brevibacterium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Fusarium</i>	
<i>Burkholderia</i> (+)	<i>Saccharomyces</i>	<i>Gliocladium</i>	
<i>Corynebacterium</i>	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Lulworthia</i>	
<i>Flavobacterium</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Penicillium</i>	
<i>Mycobacterium</i> (+)	<i>Trichosporon</i>	<i>Varicospora</i>	
<i>Nocardia</i>	<i>Yarrowia</i> (+)	<i>Verticillium</i>	
<i>Pseudomonas</i> (+)			
<i>Rhodococcus</i> (+)			
<i>Sphingomonas</i>			
<i>Streptomyces</i>			

Tab. 4.I: Liste von Gattungen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen mit der Fähigkeit, Kohlenwasserstoffe auf aeroben Wege abzubauen.³³

Unter den marinen hydrocarbonoclastischen Bakterien tritt eine kleine, definierte Gruppe von Organismen hervor, die in ihren Fähigkeiten alle anderen ölabbauenden Bakterien übertrifft: Es handelt sich um die Gattungen *Oleispira*, *Oleiphilus*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus* und *Alcanivorax*. Bei allen diesen Organismen handelt es sich um Meeresbakterien mit sehr extremen Anpassungen an den Ölabbau im Meer: So verfügen diese Gattungen über ein sehr enges Substratspektrum, dass sich nur auf wenige Kohlenwasserstoffe beschränkt⁵⁸. Dabei ist die Spezialisierung der einzelnen Gattungen sehr hoch: während *Cycloclasticus* beispielsweise nur auf aromatische und polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) beschränkt ist⁶⁵, verwendet *Alcanivorax* aliphatische und verzweigte Kohlenwasserstoffe^{48, 54, 55}. *Oleispira* hingegen unterscheidet sich von den übrigen genannten Gattungen durch niedrigere Wachstumstemperaturen und erschliesst dadurch Lebensräume in kalten Meeren, zum Beispiel in den Polargebieten^{58, 63, 68}. Unter all diesen Gattungen sticht dennoch *A. borkumensis* durch die bereits einleitend aufgeführten Eigenschaften zur Primärbesiedlung der Grenzflächen des Öls hervor.

Die Entwicklung dieser besonderen Fähigkeiten ist relativ umstritten: So wurde vermutet, dass sie auf den Abbau von durch Algen und anderen Primärproduzenten produzierten Kohlenwasserstoffen zurückzuführen ist^{1, 111}, in Folge von natürlichen Öleinträgen ins Meer durch Risse in Öllagerstätten am Meeresboden entstanden ist, oder durch die latente Verschmutzung des Meeres durch den Menschen^{14, 27} entwickelt wurde.

4.5 Populationsdynamik mikrobieller Gemeinschaften in ölkontaminiertem Meerwasser

Durch seine herausragenden Eigenschaften für den Ölabbau ist *A. borkumensis* der Schlüsselorganismus für die in dieser Studie eingesetzte biotechnologischen Anwendung. Dies konnte bereits in vielen Studien belegt^{26, 48 – 50, 53, 105} und auch durch die oben gezeigten Ergebnisse der Mikrokosmenstudie unterstützt werden. Hierbei konnten mittels DNA-Fingerprinting und multivariater Statistik nachgewiesen werden, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften in den Mesokosmen zugunsten von *A. borkumensis* verschieben. Wie bereits gesagt ist dies eine Beobachtung die vor allem in Mikrokosmenstudien zu dem Thema Ölabbau im Meer gemacht wird. Diese Dominanz in den Gemeinschaften ist vermutlich zurückzuführen auf eine Zahl von Transportproteinen in der Membran von *A. borkumensis*, die eine sehr starke Affinität zu Nährstoffen wie Ammonium oder Phosphat aufweisen. Ferner führen spezielle Anpassungen der Membran sowie die Produktion von membranständigen Biotensiden in Verbindung mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung zur Primärbesiedlung der Grenzfläche von Öl und Wasser. Die Gene, welche für sämtliche genannten Fähigkeiten codieren, konnten anhand einer Genomsequenzierung dieses Bakteriums nachgewiesen werden⁵⁵. *A. borkumensis* nutzt damit diese sich kurzfristig bietende Nische mit großer Perfektion aus und erhält den exklusiven Zugang zu einer energiereichen Kohlenstoffquelle in einem eigentlich nährstoffarmen Habitat.

Ölabbauende Bakterien und natürliche Mikroflora des Meeres

Es ist anhand mehrerer ähnlicher Studien belegt, dass *A. borkumensis* in Mikrokosmen aber auch in Umweltproben niemals solitär sondern in der Regel in Verbindung mit weiteren Organismen vorkommt. Von besonderem Interesse ist dabei eine Studie von Brakstadt et al., die ebenfalls auf Meerwasser der Nordsee basierte¹⁴. In diesem Fall wurde eine Anreicherung von Bakterien der Gattung *Sulfitobacter* und *Roseobacter* festgestellt. In der Tat konnte durch Eilers et al. gezeigt werden, dass Bakterien mit naher Verwandtschaft zu *Cytophaga marinoflava*, *Sulfitobacter pontiacus* und diverse Mitglieder der Familien *Roseobacter* und *Erythrobacter* infolge der Kultivierung in Präsenz eines Substrates auftreten, ihre Abundanz in Meerwasser jedoch relativ gering ist^{93, 95}. Wie durch Eilers et al. festgestellt handelt es sich um Artefakte, die infolge der Kultivierung in Mikrokosmen auftreten⁹³. Die in der Natur vorkommenden Vertreter dieser Gattungen werden jedoch auch mit natürlichen Prozessen in Verbindung gebracht; so zeichnen sich viele Vertreter der Gattung *Roseobacter* sowie die cellulolytischen Vertreter der Gattung *Cytophaga* für den Abbau von Algenbiomasse, *Sulfitobacter pontiacus* für einiger Reaktionen in Zusammenhang mit dem Schwefelkreislauf des Meeres verantwortlich^{92, 94}.

Interessanterweise zeigt ein Vergleich dieser Studie, in der unverschmutztes Meerwasser der Probennahmestation „Kabeltonne“ vor der Helgoländer Düne verwendet wurde, mit den in der hier präsentierten Mikro- und Mesokosmenstudie eine Reihe von gemeinsamen Organismen auf, zum Beispiel *Roseovarius tolerans*, *Roseobacter litoralis*, *R.algicola*, *Sulfitobacter pontiacus*, *Cytophaga latercula* sowie *C.marinoflava*. Diese Organismen gehören somit offensichtlich zur natürlichen Mikroflora der Nordsee vor Helgoland^{93, 94}.

Erstaunlicherweise konnte in keiner der Proben eine Anreicherung von *Cycloclasticus sp.*, einem in mehreren Studien^{26, 27, 50, 51} in Verbindung mit *A. borkumensis* auftretendem obligaten aromatische Kohlenwasserstoffe abbauenden Bakterium nachgewiesen werden. Dies ist umso erstaunlicher, da in einer Studie der globalen Verteilung ölabbauender Bakterien *Cycloclasticus* in den europäischen Küstengebieten⁵⁸, ferner in einer weiteren Studie in der Themsemündung nachgewiesen wurde²⁶. Das Auftreten von *Cycloclasticus* ist im Falle von Verschmutzungen durch aromatische Kohlenwasserstoffe im Meer so häufig, dass in einer Studie die Bioaugmentation mit diesem Bakterium ausdrücklich empfohlen wird¹⁰⁸. Anhand der Abb. 3.3 ist jedoch eindeutig zu erkennen, dass ein Abbau der aromatischen Fraktion der Kohlenwasserstoffe durch Mitglieder der natürlichen Mikrobengemeinschaft des Meeres stattfindet. Diese wurden jedoch nicht durch das Ausschneiden der DGGE-Banden erfasst oder sind in den Bandenmustern nicht auffällig geworden. In diesem Zusammenhang hätte eine Klonbibliothek einen besseren Überblick über die einzelnen vorhandenen Bakterien geben können, zumal eine Kultivierung von Probenmaterial mit dem aromatischen Kohlenwasserstoff Naphtalen erfolglos blieb.

Diese Ergebnisse zeigen einen allgemeinen Schwachpunkt von Mikrokosmenstudien auf: diese bieten zwar die Möglichkeit, eine große Zahl an Versuchsparametern in einzelnen Ansätzen zu variieren, durch ihr begrenztes Volumen treten jedoch einige Abweichungen wie der oben beschriebene Kultivierungseffekt auf. Ferner gelangen Bakterien, die im Meerwasser in extrem geringer Zellzahl vorhanden sind unter Umständen nicht in die Mikrokosmen. Diesem Umstand wurde durch die Verwendung von Mesokosmen abgeholfen. Durch das um den Faktor 1000 erhöhte Volumen des Versuchsansatzes wurden realistischere Bedingungen geschaffen, die insbesondere Bakterien mit sehr geringer Zellzahl im Meerwasser die Möglichkeit zum Wachstum verschaffen.

Wie in den Tabellen 3.IIa – c erkennbar treten in der Tat einige Organismen auf, die bereits in der Mikrokosmenstudie nachgewiesen wurden. So wurden erneut diverse Arten von *Roseobacter*, *Roseovarius* und *Sulfitobacter* nachgewiesen, die als Bestandteile der natürlichen Mikroflora identifiziert wurden^{93, 94}. Darüber hinaus jedoch wurden ein Vertreter der *Flavobacteriaceae* mit Verwandtschaft zu *Owenweeksia hongkongensis* sowie ein Vertreter der Alphaproteobakterien mit Verwandtschaft zu *Thalassospira lucentensis* in beiden Studien nachgewiesen. Während *Owenweeksia hongkongensis* nicht mit dem Ölabbau in Verbindung gebracht werden konnte⁹⁸, sind im Falle von *T. lucentensis* in der Tat Zusammenhänge mit dem Abbau von Öl vorhanden^{89 - 91}. Erstaunlicherweise wurde bei der Erstbeschreibung dieses Organismus durch López-López et al. festgestellt, dass dieser hauptsächlich einfache Zucker verwertet und üblicherweise in Langzeitkulturen angereichert wird. Jedoch liegen zwei neuere Studien vor, in denen zum einen *T. lucentensis* in Biofilmen auf einer mit Meerwasser gespülten Ölpipeline nachgewiesen wurde⁸⁹.

Zum anderen wurden zwei kürzlich entdeckten Arten der Gattung *Thalassospira* in einem mit Öl und Bilgenwasser verschmutzten Teich isoliert ⁹¹. Wie von Liu et al. bemerkt verfügt diese Gattung zwar über keine Fähigkeiten zum Ölabbau, da sie jedoch in mehreren Studien in Verbindung mit Ölverschmutzungen auftreten, scheinen diese Bakterien an ölabbauenden Konsortien beteiligt zu sein. In Hinblick auf die Studie von López et al. könnte eine Verbindung zu Biofilmen bestehen ⁹⁰; da dieser Organismus hauptsächlich Kohlenhydrate verwertet und Ammonium sowie Nitrat als einzige Stickstoffquelle verwertet, besteht die Möglichkeit, dass *T. lucentensis* von der Eutrophierung mit diesen Ionen profitiert und Bestandteile des Biofilms verwertet. Diese Hypothese muss jedoch noch durch genaue Analysen der ölabbauenden Biofilme mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung erfolgen.

Diversität der ölabbauenden Bakterien in den Mesokosmen

Abweichend von den Ergebnissen der Mikrokosmenstudie wurden Organismen mit naher Verwandtschaft zu *Phaeobacter inhibens*, *Terasakiella pusilla* und *Thalassolituus oleivorans* nachgewiesen. Dabei wurden mit *P. inhibens* verwandte DNA-Sequenzen in den Profilen der RNA-Proben aus der Mesokosmenflüssigkeit nachgewiesen. Die Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu *T. pusilla* und *T.oleivorans* ebenso wie solche von *A. borkumensis* wurden hingegen exklusiv auf der Oberfläche des Ölbindemittels X-Oil entdeckt. Hierbei ist besonders bemerkenswert, dass alle genannten Bakterien über die Fähigkeit zur Verwertung von Kohlenwasserstoffen verfügen. In einer Studie wurde Wasser aus der Themsemündung für Mikrokosmen eingesetzt, die zum einen mit Rohöl, einer Mischung aus Kohlenwasserstoffen, sowie jeweils mit einzelnen Komponenten des Öls als Energie- und Kohlenstoffquelle versorgt wurden. Diese Versuchsanordnung sollte die einzelnen Mitglieder eines ölabbauenden Konsortiums und ihre einzelne Rolle bzw. ihre reales Substratspektrum beim Abbau eines Kohlenwasserstoffgemisches identifizieren ²⁶. Dabei zeigte *Phaeobacter inhibens* eine verstärkte Abundanz in Mikrokosmen mit Dekan sowie langkettigen Alkanen ab einer Zahl von 22 Kohlenstoffatomen. *T. oleivorans* wurde in denselben Mikrokosmen, darüber hinaus aber auch in solchen mit Dodekan, Tetradekan und Hexadekan in großer Zahl nachgewiesen. Dies steht im Gegensatz zu einigen Studien ^{48, 50, 53}, die *A. borkumensis* insbesondere mit dem Abbau dieser aliphatischen Kohlenwasserstoffe in Verbindung bringen. In der vorliegenden Studie wurde ein Wachstum dieses Organismus jedoch auf Pristan, einem verzweigten Kohlenwasserstoff, festgestellt. In diesem Zusammenhang muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Studie mit Wasser aus einer Salzmarsch der Themsemündung durchgeführt wurde, welches sich möglicherweise in seiner Zusammensetzung stark von dem in den anderen Studien unterscheidet. Im Allgemeinen ist die oben beschriebene Verwendung von Meerwasser, Brackwasser und Sediment für Mikrokosmenstudien ein Schwachpunkt der bislang zu diesem Thema durchgeführten Experimente. Ferner werden völlig unterschiedliche Ausgangs- und Versuchsbedingungen und Dimensionen der Mikrokosmen verwendet. So ist es nicht verwunderlich, dass ähnlich aufgebaute Studien vollkommen gegensätzliche Ergebnisse produzieren. Für eine realistische Bestimmung des Potenzials zum marinen Ölabbau müssten daher einheitliche oder international standardisierte Versuchsbedingungen für Mikro- oder Mesokosmenversuche zum marinen Ölabbau festgelegt werden.

Mikrobieller Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen

Neben den bereits beschriebenen Organismen wurde in derselben Studie auch *Cycloclasticus sp.* nachgewiesen, welcher in Mikrokosmen mit aromatischen Kohlenwasserstoffen besonders häufig auftrat ²⁶. Wie bereits erwähnt nimmt dieser Organismus aufgrund seiner häufigen Abundanz im Falle von Verschmutzungen durch aromatische Kohlenwasserstoffe im Meer und seine besonderen Fähigkeiten einen ähnlichen Stellenwert für diese Bestandteile des Öls ein wie *A. borkumensis* für aliphatische Kohlenwasserstoffe.

Umso erstaunlicher ist daher die Tatsache, dass im Gegensatz zu *A. borkumensis*, *T. oleivorans*, *P. inhibens* und *T. pusilla* dieser Organismus in den vorliegenden Studien nicht nachgewiesen werden konnte. Wiederum ist hierfür vermutlich der vollkommen von bisherigen Studien abweichende Versuchsaufbau, sowie die Besonderheiten des Meerwassers vor Helgoland verantwortlich. Bislang wurde *Cycloclasticus* in Küstennähe ⁵¹, Häfen ⁵⁰ oder Flussmündungen ²⁶ beobachtet, wobei im Gegensatz zum Ort der Probennahme in dieser Studie meist eine Eintrag von aromatischen Kohlenwasserstoffen vorlag. Anhand der in den Abb. 3.20 und 3.21 präsentierten Gelen und phylogenetischen Bäumen konnten zwei Organismen mit Verwandtschaft zu *Yeosuana aromativorans* ^{58, 99} und *Lutibacterium annuloederans* ¹⁰⁰ nachgewiesen werden. *Y. aromativorans* wurde in Mikrokosmen, welche mit Benzopyren und Pyren, zwei krebserregenden aromatischen Kohlenwasserstoffen, versetzt waren, aus Sediment der Gelben See angereichert und isoliert ⁹⁹. Es verfügt über die Fähigkeit, eine Reihe von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen abzubauen. *L. annuloederans* hingegen wurde in einer stark verschmutzten Zone des Hafens von Boston in Verbindung mit *Cycloclasticus spirillensis* isoliert, wo es den Abbau von Phenanthren massgeblich beschleunigt hat ¹⁰⁰. Dieser Organismus wurde jedoch auch in einer zweiten Mikrokosmenstudie ³⁷, welches Sediment als Inokulum und Rohöl als Energiequelle verwendete, nachgewiesen. Das Fehlen von *Cycloclasticus* steht hier im Gegensatz zur Fachliteratur, kann jedoch anhand der Umweltbedingungen vor Helgoland relativ einfach erklärt werden: *Cycloclasticus* gehört zu den obligaten ölabbauenden Bakterien, wobei dieser Organismus auf aromatische Kohlenwasserstoffe spezialisiert ist ⁵⁸.

Im Gegensatz zu *Cycloclasticus* verwerten aber sowohl *L. annuloederans* als auch *Y. aromativorans* neben aromatischen Kohlenwasserstoffe ein breiteres Substratspektrum an Zuckern und Aminosäuren. In beiden Fällen könnte ein Zusammenhang mit der Verwertung von Biomasse der in den Tangwäldern vor Helgoland auftretenden Braunalgen bestehen ¹¹¹. Bemerkenswert ist hierbei, dass die *Y. aromativorans* zugeordnete Bande vom Versuchstag 14 bis zum Versuchsende sowohl auf der Oberfläche des Ölbindemittels als auch in der Mesokosmenflüssigkeit, die *L. annuloederans* zugeordnete Bande jedoch erst vom Versuch 24 bis zum Ende des Versuches und nur im Meskosmenwasser nachgewiesen werden konnte.

Obwohl zur genauen Bestimmung der Rolle der beiden in der Mesokosmenstudie nachgewiesenen Bakterien noch eine Isolierung und Kultivierung notwendig ist, deuten diese Ergebnisse an, dass eines oder beide hier nachgewiesenen Bakterien einen Anteil am Abbau der aromatischen Kohlenwasserstoffe haben und ferner zu einer ganzen Reihe von Mikroorganismen gehören, die direkt oder indirekt mit dem Abbau von Öl im Meer zusammenhängen. Insgesamt umfasst diese Gruppe sieben Vertreter der Gattungen *Alcanivorax*, *Thalassolituus*, *Phaeobacter*, *Lutibacterium*, *Yeosuana*, *Terasakiella* und *Thalassospira*. In wie weit diese Organismen als Konsortium vorliegen, ließ sich mit dem vorliegenden Versuchsaufbau nicht gänzlich klären. In diesem Zusammenhang sollten eingehende Untersuchungen der Biofilme mit molekularbiologischen Methoden sowie Fluoreszenz- oder konfokalmikroskopischen Analysen mit speziell auf diese Organismen angepassten FISH-Sonden sowie eines auf die Biofilme und Autofluoreszenz des Schweröls angepassten Protokolls erfolgen. Abb. 4.1 zeigt einen solchen mit dem interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbten Biofilm.

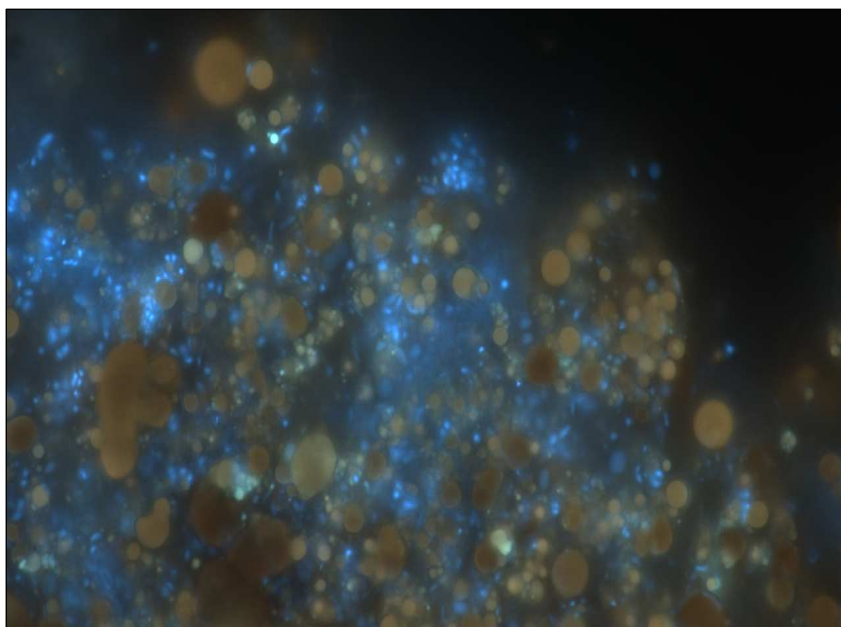


Abb. 4.1: Biofilm von ölabbauenden Mikroorganismen, Mesokosmos I, Versuchstag 36. Der Biofilm wurde mit DAPI angefärbt und mittels eines Zeiss Axioskops visualisiert. Deutlich erkennbar sind hellbraune Micellen des Schweröls, sichtbar durch starke Autofluoreszenz sowie durch DAPI blau gefärbte Bakterienzellen

Die Anwesenheit von *Y. aromativorans* und *L. annuloederans* anstelle des höher spezialisierten *Cycloclasticus* zeigt hierbei sowohl die Funktionalität des Meerwassers als auch die Redundanz der mikrobiellen Gemeinschaften in diesem Ökosystems.

Ökologie des marinen Kohlenwasserstoffabbaus

In der Tat wurden in mehreren Studien Zusammenhänge zwischen der Diversität und der Funktionalität eines Ökosystems hergestellt ^{118, 119}. So ist in marinen Ökosystemen mit hoher Diversität bedingt durch die Vielzahl an bakteriellen Arten auch eine Vielzahl an potenziell durchführbaren Stoffwechselwegen vorhanden. Neben der Funktionalität werden gleichzeitig auch die

Plastizität und die Resistenz von mikrobiellen Gemeinschaften durch eine hohe Diversität beeinflusst. Der Faktor Plastizität – die Fähigkeit nach einer Störung der mikrobiellen Gemeinschaft wieder in den Ausgangszustand zurückzukehren – wird dabei beeinflusst durch die Verflechtungen der mikrobiellen Gemeinschaft untereinander. Je mehr Mikroorganismen in einem Ökosystem interagieren und in der Verwertung ihrer Substrate miteinander kooperieren, desto schwieriger ist die Eliminierung eines einzelnen Organismus aus dem System. Parallel hierzu kann durch die große Zahl an potenziellen Stoffwechselwegen ein einzelner durch eine Störung ausfallender Stoffwechselweg kompensiert werden. Ein gutes Beispiel für Plastizität in einer mikrobiellen Gemeinschaft sind die obligaten ölabbauenden Bakterien. Diese zeigen im Falle austretenden Öls im Meer aufgrund ihrer hohen Spezialisierung ein massives Wachstum auf, wodurch die natürliche mikrobielle Gemeinschaft des Meeres aus ihrem natürlichen Gleichgewicht gebracht wird. Da sie aber in ihrer Ernährung auf Kohlenwasserstoffe limitiert sind, sterben diese Bakterien nach Verbrauch ihres Substrates schnell wieder ab und bieten als Biomasse ein Substrat für andere Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft des Meerwassers. Eine hohe Diversität spezialisierter Organismen ermöglicht wegen solcher Mechanismen eine bessere Adaptation an sich schnell verändernde Umweltbedingungen. Andererseits ist ein System, welches nur aus wenigen Spezialisten wie *A. borkumensis* besteht, aufgrund der wenigen verfügbaren Stoffwechselwege zwar sehr gut geeignet Öle abzubauen, es kollabiert jedoch nach dem Verbrauch der Kohlenwasserstoffe unwiderruflich, da es das Fehlen des Substrats nicht kompensieren kann. Wie durch Lorreau et al. festgestellt, ist eine hohe Diversität somit eine Art von „Puffer“, der sich nicht nur auf ein hohes metabolisches Potenzial beschränkt, sondern die Flexibilität der Gemeinschaft erhöht und sie somit auch vor Verschiebungen durch andere Stressfaktoren in ihrer Umwelt schützt⁶⁹.

Dabei wurde das Ergebnis der Mikrokosmen- unterstützt durch die Mesokosmenstudie, in der relativ komplexe Gemeinschaften sowohl auf der Oberfläche des Ölbindemittels als auch in der Mesokosmenflüssigkeit nachgewiesen wurden. Da das Meer vor Helgoland nicht nur saisonal bedingt sondern auch durch die vorhandenen Tangwälder, den unterschiedlichen Einfluss der Elbe und Weser in Abhängigkeit von Ebbe und Flut sowie verschiedene saisonal bedingte Blüten von Mikroalgen einen sehr heterogenen Lebensraum darstellt, ist eine hohe mikrobielle Diversität nicht ungewöhnlich¹²⁰.

Die ökologische Bedeutung der Diversität stellt im Zusammenhang mit biotechnologischen Methoden zum Ölabbau jedoch vor allem die Bioaugmentation, eine von aussen künstlich in das Ökosystem eingebrachte Verschiebung, in Frage. So führt unter Berücksichtigung der oben genannten Studien eine massive Zugabe eines einzelnen optimal an den Ölabbau angepassten Organismus zu einer starken Verschiebung der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft. Es könnte somit zu einem Verlust an Diversität und zu einer reduzierten Stressresistenz sowie zu schlechteren Ergebnissen beim Ölabbau kommen, da wie in den Studien von McKew et al., Yakimov et al. und der hier präsentierten Mesokosmenstudie zu erkennen ist, sind häufig mehrere Organismen am Abbau komplexer Schadstoffgemische beteiligt^{26, 50}. Die Zugabe eines einzelnen Organismus, der wie zum Beispiel *A. borkumensis* über eine effektivere Aufnahme von Nährstoffen verfügt, kann somit andere Ölabbauer in ihrer Tätigkeit behindern oder verlangsamen. Eine mögliche Antwort auf diese Frage wird durch Thompson et al. in einer Studie zur Bioaugmentation gegeben: der Erfolg der Bioaugmentation hängt von der Wahl des Organismus, der in das System zugegeben wird, ab. Die Zugabe künstlich zusammengestellter „Konsortien“ hingegen wird der Komplexität der meisten Öle und Umweltbedingungen am Ort der Ölverschmutzung in der Realität nicht gerecht⁴⁷. Unter Berücksichtigung der oben genannten Studien von Griffith et al. sowie Giller et al. scheitern diese künstlichen Konsortien an der Plastizität der natürlichen mikrobiellen Gemeinschaften im Meer^{118, 119}. Umso erstaunlicher ist jedoch, dass Bioaugmentation mittels einzelner ausgesuchter Mikroorganismen scheinbar von Erfolg gekrönt wird. Thompson et al. empfehlen in diesem Zusammenhang die Verwendung von Organismen, die der Zusammensetzung der Verschmutzung und den Umweltbedingungen im Großen und Ganzen gerecht werden und in vergleichbaren Situationen verstärkt auftreten. Eine solche Strategie hat den Vorteil, einen Trend bzw. eine Veränderung, die die natürliche Mikrobengemeinschaft des Meerwassers durchläuft, vorwegzunehmen oder zu beschleunigen.

In diesem Zusammenhang wird die Zahl der biotechnologisch anwendbaren Mikroorganismen begrenzt, wie die globale Verteilung der marinen hydrocarbonoclastischen Bakterien zeigt⁵⁸. So wären beim heutigen Stand der Forschung *Alcanivorax borkumensis* und *Cycloclasticus pugettii* Organismen, die bevorzugt in gemässigten Zonen eingesetzt werden müssten, wohingegen *Oleiphilus messinensis* in warmen, *Oleispira antarctica* und auch *Thalassolituus oleivorans* in kalten Meeren zum Einsatz kämen. Allen Organismen gemein ist ihr Lebensstil: es handelt sich um Organismen, die aus einer durchaus langwierigen Ruhephase heraus schnell anwachsen können und in kürzester Zeit ihr Substrat verbrauchen. Solche Organismen wurden von Hirsch et al. analog zu Metazoen als r-Strategen bezeichnet^{47, 121}. Diese Organismen sind insbesondere bei Ölverschmutzungen, bei deren Beseitigung Eile geboten ist, von hohem Interesse, ferner wird durch ihr Absterben nach Verbrauch ihrer Nahrung das Problem von überschüssiger Biomasse gelöst.

Das Gegenstück zu diesem Lebensstil wird durch die so genannten K-Strategen aufgezeigt^{47, 121}. Zu den K-Strategen zählt nach dieser Definition ein großer Teil der natürlichen Flora des Meeres, zum Beispiel Gattungen wie *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* und *Roseobacter*^{93, 95}. Diese Organismen verfügen über gleichmässige Wachstumsraten und Metabolismen, wodurch sie unabhängig von der Menge des vorhandenen Substrats dieses über einen langen Zeitraum kontinuierlich abbauen. Aufgrund dieser konstanten Präsenz der K-Strategen sind diese vor allem für biotechnologische Anwendungen sinnvoll, in denen Zeit keine Rolle spielt, beispielsweise bei der Bioremediation von verseuchten Böden, oder aber wie im Falle von immobilisierten Schadstoffen.

Eine der Gefahren der Anwendung von r-Strategen wie *A. borkumensis* bleibt jedoch die massive Vermehrung dieser Bakterien in Verbindung mit der unkontrollierten Produktion von Biomasse und der Verdrängung anderer wichtiger Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft, die in späteren Phasen des Ölabbaus oder bei der Rückkehr der mikrobiellen Gemeinschaft in ihren Ursprungszustand eine Rolle spielen. Diese Gefahr besteht insbesondere im Falle von Bioremediationsversuchen, da mit großen Mengen an Nährstoffen gearbeitet wird, um eine Limitation des Ölabbaus durch Nährstoffmangel zu vermeiden. Damit wird ein wichtiger Kontrollmechanismus – die so genannte „Bottom up“-Kontrolle – die Wachstum und Biomasse über eine solche Nährstofflimitation regelt, ausgeschaltet. In der oben präsentierten Mesokosmenstudie konnte gezeigt werden, dass der biologische Abbau von Öl im Meer in Wirklichkeit mehreren Kontrollmechanismen unterliegt.

4.6 Predation - Kontrolle ölabbauender Bakteriengemeinschaften durch Grazing

Obwohl die Interaktionen von Bakterien und Öl seit über 50 Jahren in zahlreichen Experimenten untersucht wurden, existieren nur wenige Studien über die weiterführenden Interaktionen zwischen den ölabbauenden Mikroorganismen, dem marinen Picoplankton und dem Zooplankton. Diese Interaktion mit den marinen Nahrungsnetzen ist jedoch von Bedeutung, wenn man das Ausmass einer Störung dieser Nahrungsnetze durch Ölverschmutzungen berücksichtigt. So wirkt sich Öl im Meer auf zwei Arten aus: zum einen werden Teile des Zooplanktons und des Picoplanktons durch das Öl geschädigt. Van Bernem und Lübke berichten, dass insbesondere Krebs- und Fischlarven, die einen großen Teil des Zooplanktons ausmachen, eine erhöhte Morbidität und Mortalität zeigen¹⁶. Gleichzeitig wird berichtet, dass Predatoren und Endkonsumenten wie Fische, marine Säugetiere das Öl im Meer meiden¹⁶. Ein zweiter Effekt des Öls ist dessen Umsetzung in Biomasse. So würden 1000 Tonnen Öl im Meer durch Bioremediation im Idealfall umgesetzt werden in 100.000 kg bakterielle Biomasse, die sich auf einen kleinen Bereich des Meeres konzentriert, was zu einer Eutrophierung dieses Bereiches führen würde. Jedoch wurden solche Anhäufungen selbst im Falle von Bioremediations-Feldstudien nie beobachtet.

Eine unerwartete Beobachtung, die im Rahmen der oben präsentierten Mesokosmenstudie gemacht wurde, gibt eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen. In dieser Studie konnten acht Tage nach Versuchsbeginn eine Blüte von Flagellaten, wenige Tage später eine Blüte von Ciliaten und Amöben festgestellt werden, während der die Zellzahlen dieser Predatoren sich um den Faktor sechs bis sieben steigerten.

Die Artenvielfalt dieser räuberischen Protozoen („Grazer“) schien hierbei auf fünf Arten von Ciliaten und eine Art von Amöben sowie auf wenige Arten von Flagellaten begrenzt zu sein. Anhand der Gesamtrespiration und dem mikrobiellen Wachstum sowie der Zahl an Protozoen konnte festgestellt werden, dass in der Tat ein Zusammenhang zwischen Protozoen und mikrobiellen Gemeinschaften besteht. Abb. 4.2 korreliert die Verläufe aller drei Parameter in einem Diagramm.

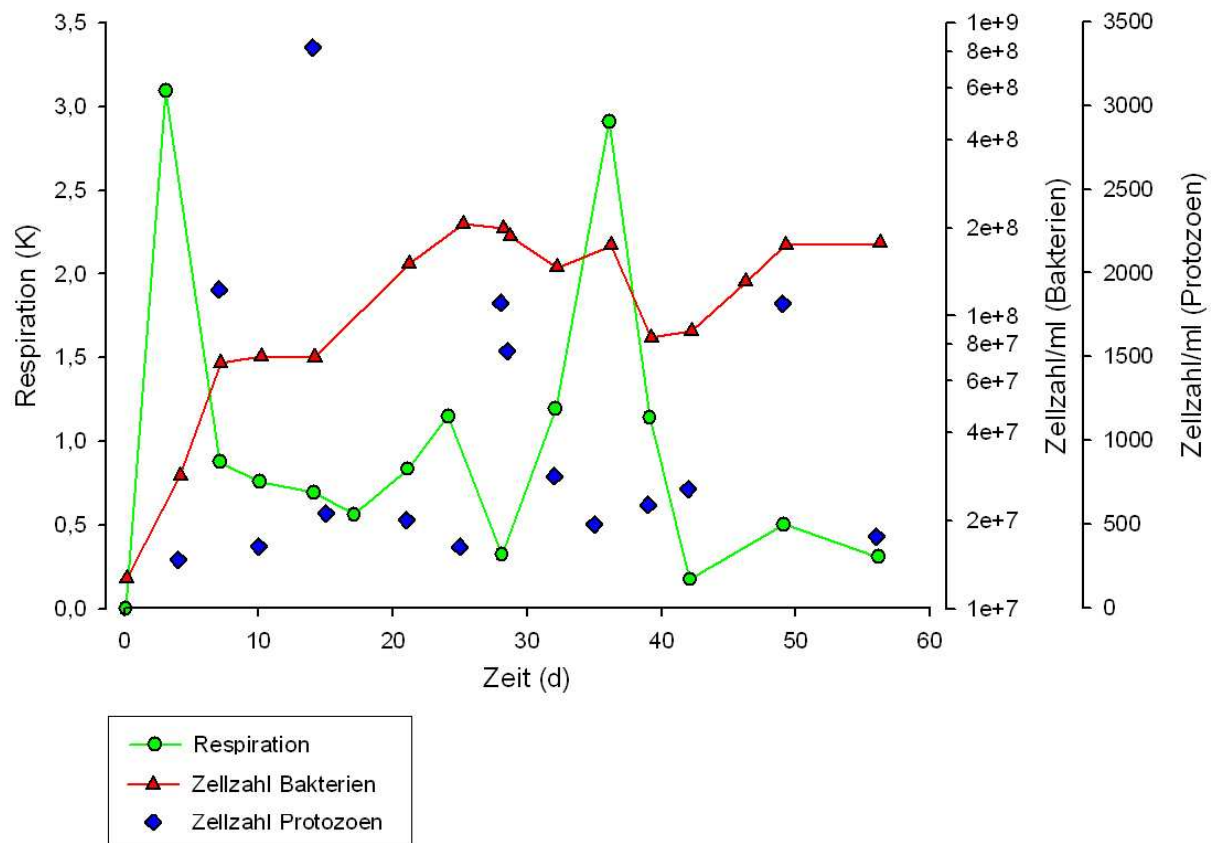


Abb. 4.2: Respiration sowie Zellzahl der Protozoen und Bakterien in der Flüssigkeit des Mesokosmos I in Korrelation zur Versuchszeit. Die Messung der Respiration erfolgte mittels der oben beschriebenen modifizierten Methode nach Winkler; der Wert K ist ein dimensionsloser relativer Wert, der sich aus der Intensität des Verbrauchs von Sauerstoff über die Zeit ergibt. Die Zellzahlen der Bakterien wurden mikroskopisch mittels einer Neubauer-Kammer, jene der Protozoen mittels einer Sedgewick-Rafter-Kammer bestimmt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Mittelwerte ohne Fehlerbalken aufgetragen. Diese können den im Ergebnisteil aufgeführten Einzeldiagrammen entnommen werden.

Wie aus dem Diagramm zu entnehmen ist, korrelieren in der Tat hohe Konzentrationen von Protozoen mit einer Stagnation oder einem Rückgang der bakteriellen Zellzahl sowie einem 75%tigen Rückgang der Gesamtrespiration in den Mesokosmen. Somit gibt es eine direkte und unmittelbare Reaktion der Population der Protozoen auf den Anstieg der bakteriellen Zellzahl. Besonders bemerkenswert ist die Reaktion der Protozoen an den ersten Versuchstagen, die innerhalb weniger Tage erfolgt ist.

Diversität der Predatorengemeinschaft

Erstaunlicherweise wurden erste Beobachtungen des Grazings in Verbindung mit Ölverschmutzungen bereits 1922 gemacht¹²², nur fünf Jahre, nachdem ölabbauende Bakterien erstmals entdeckt wurden²⁸. In Bilgenwässern von Öltankern wurde eine auffällige Anhäufung von Flagellaten (*Bodo* sp.), Ciliaten (*Oxyrrhis marina*; *Dinophrys* sp.) und Amöben (*Amoeba* sp.) beobachtet. In einer mikroskopischen Studie von Andrews und Floodgate aus dem Jahre 1974 wurden Protozoen beobachtet, die „Ölrückstände sowohl im Labor als auch im Feld“ aufnehmen¹²³. In dieser Studie, die ebenfalls Meerwasser der Nordsee verwendete, wurden Ciliaten nachgewiesen, die morphologisch den in der Mesokosmenstudie beobachteten Protozoen sehr ähnlich sind. Offensichtlich scheinen nur einige wenige Arten von Protozoen auf die hohe Konzentration der Biomasse in Folge des Ölabbaus zu reagieren. Da im Gegensatz zu den oben genannten Studien für diese Arbeit nicht nur mikroskopische sondern auch molekularbiologische Methoden zur Verfügung standen, konnten mittels Sequenzierung der 18S rDNA einige der Protozoen anhand von phylogenetischen Bäumen zugeordnet werden.

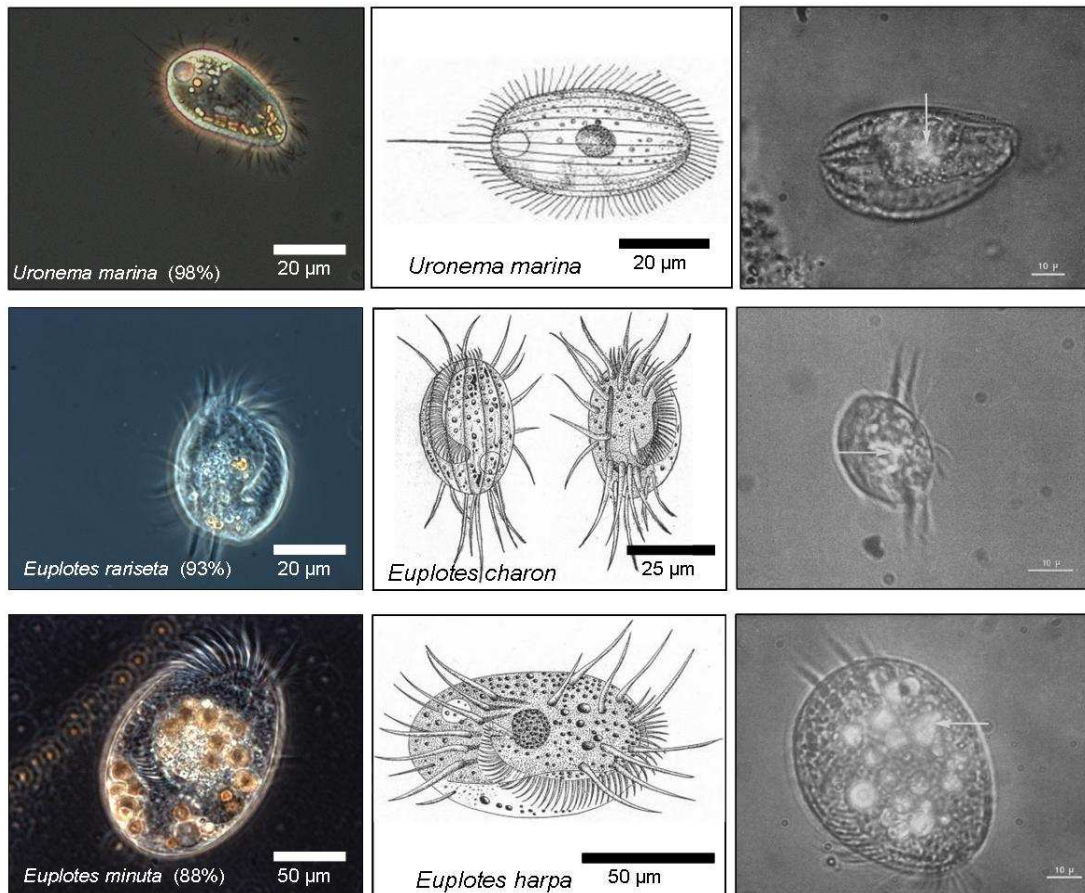


Abb. 4.3: Vergleich dreier im Mesokosmenversuch beobachteter Protozoen (l.) mit Abbildungen aus einem Bestimmungsschlüssel¹²⁴ (Mitte) sowie mit Protozoen aus einer oben genannten Studie zur Aufnahme von Öl durch Protozoen¹²³ (rechts). Weiße Pfeile in den rechten Abbildungen deuten auf aufgenommenes Öl hin. Die Namen in den linken Abbildungen geben den nach Sequenzierung der 18S rDNA ermittelten nächsten Verwandten, Zahlen in Klammern hinter den Namen geben die Ähnlichkeit der 18S rDNA-Sequenz in Prozent an.

Die Abb. 4.3 zeigt einen Vergleich der im Versuch beobachteten mit einem Bestimmungsschlüssel und den durch Andrews und Floodgate im Jahre 1974 in mit Rohöl behandelten Meerwassermikrokosmen angezüchteten Protozoen^{123,124}. Wie aus dem Vergleich zum Bestimmungsschlüssel hervorgeht, bestehen erhebliche Diskrepanzen zwischen der Morphologie und den molekularbiologisch ermittelten Daten. So zeigten die beiden Mitglieder der Gattung *Euplotes* eine starke Ähnlichkeit zu *E. rariseta* und *E. minuta*. Zu beiden Spezies liegen jedoch keine verfügbaren Abbildungen vor. Ein Problem in Bezug auf die Taxonomie von Protozoen besteht in der geringen Menge an vorhandenen molekularbiologischen Daten, zumal die Identifikation in der Regel anhand der Morphologie dieser Organismen durchgeführt wird. Jedoch zeigt die obere Abbildung, dass im Falle von *Uronema marina* Morphologie und molekularbiologische Bestimmung übereinstimmen. Ein Vergleich der drei beobachteten Protozoenarten mit den bereits 1974 durch Andrews et al. beobachteten Einzellern weist eine erstaunliche Übereinstimmung der Morphologie¹²³ auf. Da zum Zeitpunkt dieser Studie jedoch noch keine molekularbiologischen Methoden etabliert waren, kann keine eindeutige Übereinstimmung bestätigt werden. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass zumindest verwandte Arten unter vergleichbaren Bedingungen im Falle von Ölverschmutzungen im Wasser auftreten oder eine konvergente Entwicklung unterschiedlicher Arten vorliegt. Protozoen mit einer Morphologie wie die oben gezeigten zählen zu den benthischen Protozoen, welche hauptsächlich auf Biofilmen, „marine snow“ – Biomasseaggregaten im Meerwasser – oder auf verrottendem Algenmaterial leben. Sie können sich aufgrund ihrer Cirren (Cilienbündel) sehr schnell fortbewegen und auch gut an das Substrat heften. Mittels einer Vielzahl von Cilien um den Zellmund (Cytostom) können sie Biomasse von der Oberfläche von Biofilmen entfernen. Somit bilden Biofilme ölabbauender Bakterien im Meer ein Substrat, welches der natürlichen Nahrungsquelle dieser Protozoen sehr ähnlich ist⁷¹.

Neben den oben gezeigten Arten konnten noch zwei weitere Protozoen im Mesokosmos I beobachtet werden, die eine hohe Abundanz zeigten.

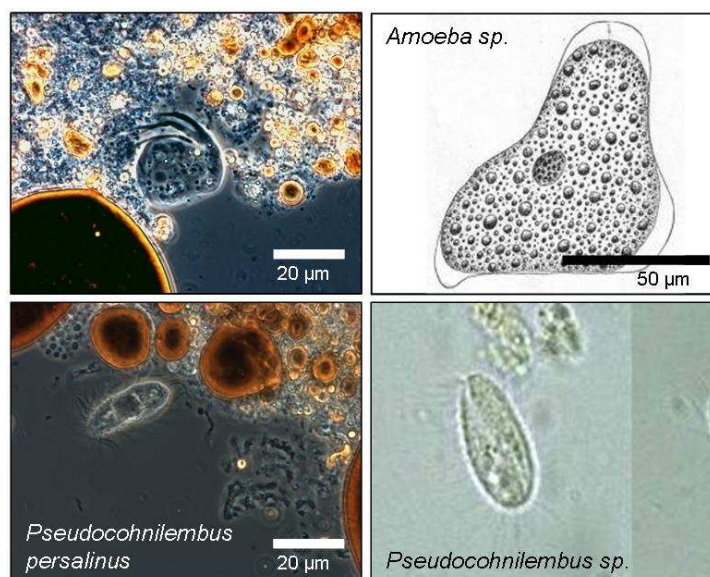


Abb. 4.3 Vergleich zweier im Mesokosmenversuch beobachteter Protozoen (l.) mit Abbildungen aus einem Bestimmungsschlüssel¹²⁴ (oben rechts) sowie mit einer Internetdatenbank (www.protist.hosei.jp) (unten rechts). Die Namen in den Abbildungen geben den nach Sequenzierung der 18S rDNA ermittelten nächsten Verwandten.

Bei den oben gezeigten Protozoen handelte es sich um eine Amöbe sowie einen weiteren Vertreter der Unterklasse *Scuticocilliatia*. Beide Organismen traten in den Mesokosmen in sehr hoher Zahl auf, wie aus Abb. 3.18d, e und f hervorgeht. Der Ciliat in der unteren Abbildung ist ein gutes Beispiel für die Diskrepanz zwischen morphologischer und molekularbiologischer Identifikation dieser Organismen, da diese Spezies anhand der Morphologie zunächst als *Philaster sp.* identifiziert wurde, eine molekularbiologische Untersuchung jedoch eine nahe Verwandtschaft zu *Pseudocohnilembus persalinus* ergab. Von besonderem Interesse sind ferner die nicht näher identifizierten Amöben, weil diese wie in Abb. 3.18j erkennbar auch andere Protozoen als Nahrung verwerten können und somit auch die Zusammensetzung der Protozoengemeinschaft in den Mesokosmen beeinflussen konnten. Leider konnten diese Organismen nicht molekularbiologisch identifiziert werden. Eine Bestimmung anhand der Morphologie wiederum ist für Amöben nahezu unmöglich.

Jedoch berichtet eine Studie von Munson und Paget über eine Anreicherung von Amöben in Meerwasser infolge von Verschmutzungen. Hierbei wurde vor allem *Acanthamoeba griffinii* sehr häufig nachgewiesen. Die Abundanz von Amöben sowie ihre Diversität korrelierten dabei insbesondere mit dem Grad der Verschmutzung des Meerwassers. So wurden besonders im Falle von Ölverschmutzungen in der Mündung des Flusses Humber eine hohe Zahl dieser Protozoen beobachtet. Munson und Paget erwähnen in diesem Zusammenhang, dass einige Gattungen von *Acanthamoeba* durchaus humanpathogen sein können ¹²⁶.

In der Tat ist das Auftreten von Protozoen in Anwesenheit von Kohlenwasserstoffen im Meer relativ ungewöhnlich, da diese Organismen in der Regel über keinerlei Schutzmechanismen gegenüber den hydrophoben Eigenschaften dieser Schadstoffe verfügen. So berichten Cox et al., dass in einer Studie zur Reduktion der Biomasse durch Protozoen, dass *Tetrahymena pyriformis*, ein Ciliat, zwar bei niedrigen Konzentrationen von Toluol den mikrobiellen Abbau dieses Schadstoffes beschleunigen kann, bei höheren Konzentrationen jedoch abstirbt ¹²⁷. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten der beobachteten Protozoen könnte also in einer besseren Toleranz gegenüber aufgenommenem Öl liegen. Andererseits bleibt zu berücksichtigen, dass das Öl nicht direkt aufgenommen wird, sondern vielmehr Biofilme ölabbauender Bakterien, welche das Öl umschliessen. Diese Tatsache konnte Andrews und Floodgate zum Zeitpunkt ihrer Publikation noch nicht bekannt gewesen sein.

Grazing als Kontrollmechanismus: „Top down“-Kontrolle und „Killing the winners“-Strategie

Die oben gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass Grazing durch Protozoen ein komplexer Prozess ist, welcher ebenfalls durch eine eigene Populationsdynamik gekennzeichnet ist und sogar selbst wie in Abb. 3.18j sichtbar der Predation unterliegt. Es handelt sich bei diesem Prozess um eine natürliche Kontrolle der Biomasse bzw. der Bakterienpopulationen in Systemen, in denen keine Nährstofflimitation vorliegt. Dieser Mechanismus ist das Gegenstück zur „Bottom up“-Kontrolle, in der das Wachstum von Bakterien von der optimalen Verwertung und dem Kampf um die vorhandenen Ressourcen abhängt und wird „Top down“-Kontrolle genannt ⁷¹. Dabei unterliegen mikrobielle Gemeinschaften unter oligotrophen Bedingungen meist einer „Bottom up“-Kontrolle, unter eutrophen Bedingungen hauptsächlich einer „Top down“-Kontrolle. Bei dieser Form der Kontrolle von Biomasse im Meerwasser handelt es sich um einen essentiellen Mechanismus, der für die Rückführung von Nährstoffen und gelösten organischen Kohlenstoffverbindungen ins System zuständig ist.

Hierbei wird die „Microbial loop“, ein Stoffkreislauf, der von Prokaryoten über Einzeller, Mikro-, Makrozooplankton bis hin zu den Endkonsumenten – Fischen, Vögeln und Meeressäugtieren - und zurück zur gelösten Biomasse führt, abgekürzt. Biomasse wird dadurch schneller im System umgesetzt. In der Konsequenz ist das Ökosystem Meerwasser flexibler und schneller in der Lage auf Veränderungen zu reagieren, da essentielle Nährstoffe in den untersten Trophiestufen schneller zur Verfügung stehen ⁷¹. Neben diesen positiven Effekten senkt die Predation durch Protozoen aber auch die Zellzahlen der vorhandenen Bakterien, was insbesondere im Falle von Bioremediationsversuchen negative Auswirkungen haben kann. Durch die in Folge der Predation erhöhte Mortalität der schadstoffabbauenden Bakterien kann der Prozess der Bioremediation entweder aufgehalten oder zumindest verlangsamt werden.

Bioremediationsversuche werden vor allem durch Predation beeinflusst, weil sie – wie oben beschrieben – meistens von der Tätigkeit einer oder mehrerer so genannter r-Strategen abhängen, Organismen, die in kurzer Zeit einen hohen Titer in den verschmutzten Bereichen erreichen. Ferner wurde die Möglichkeit der Bioaugmentation angesprochen, bei der große Mengen an Zellzahlen dieser Bakterien künstlich ins System eingefügt werden. In beiden Fällen bildet diese große Zahl an Zellen ein großes Nahrungsangebot für Predatoren und zieht das Wachstum einer großen Zahl an Räubern nach sich, da auch für diese die Limitierung der Nahrung entfällt. Diese Entwicklung ist bekannt als „Killing the winners“-Phänomen und für eine Vielzahl von Räuber-Beute-Beziehungen beschrieben worden ¹²⁷.

Das Auftreten dieses Phänomens ist in Abb. 4.2 deutlich erkennbar: So oszillieren sowohl die bakteriellen als auch die Zellzahlen der Protozoen, wobei eine zeitliche Verschiebung von einigen Tagen erkennbar ist. Eine Ausnahme bildet dabei die Protozoenpopulation, die am Versuchstag 10 einen Einbruch verzeichnet. Der Grund hierfür ist möglicherweise eine Verschiebung der Gemeinschaften von Protozoen im Mesokosmos: interessanterweise variieren auch die Populationen der Grazer mit der Menge an Biomasse im System: So finden sich in schwach verschmutzten Habitaten hauptsächlich Nanoflagellaten, während in Habitaten mit großen Mengen an Biomasse Ciliaten und andere große Protozoen dominieren ⁷¹. So konnten auch hier bei steigender Bakterienzellzahl zunächst hohe Mengen an Flagellaten beobachtet werden, denen Ciliaten und Amöben folgten, wie aus der DNA-Fingerprinting-Analyse der eukaryotischen Gemeinschaften hervorging.

Es stellt sich jedoch die Frage, ob es sich hier um eine wirkliche „Killing the winners“-Strategie handelt, bei der die erfolgreichsten Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft durch Protozoen verstärkt gefressen werden. Eine Antwort gibt ein Vergleich der Bandenprofile in den Abbildungen 3.19 a bis c. So zeigte sich auf der Oberfläche des Ölbindemittels X-Oil eine starke Bande des ölabbauenden Bakteriums *Alcanivorax borkumensis*, jedoch waren nur an wenigen Versuchstagen schwache Banden dieses Organismus in Proben aus der Mesokosmenflüssigkeit zu beobachten. In einem parallelen Datensatz, der die extrahierte RNA aus dem Wasser in Mesokosmos I verwendete, wurden wiederum entsprechende Banden festgestellt. Dies bedeutet, dass *A. borkumensis* in der Mesokosmenflüssigkeit vorhanden war, aber nur in sehr geringer Zellzahl vorlag. An der Oberfläche des Ölbindemittels jedoch war offensichtlich Biomasse dieses Organismus vorhanden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Mikrokosmenstudie, in der *A. borkumensis* auch in der Emulsion in den Mikrokosmen, die jedoch keine Protozoen enthielten, nachzuweisen war.

Selektivität der Predation

Die oben gezeigten Ergebnisse deuteten an, dass *A. borkumensis* in verstärktem Masse der Predation durch Protozoen ausgesetzt ist. In der Tat ist eine Selektivität der Predatoren für einzelne Bakteriengruppen oder sogar Arten bekannt. Wootton et al. berichten hierbei sogar über biochemische Mechanismen, die es den Protozoen erlauben, ihre Beute zu erkennen. So wurde auf der Oberfläche des Flagellaten *Oxyrrhis marina* ein calciumabhängiges mannosebindendes Lektin nachgewiesen, welches eine Erkennung von mannosehaltigen Oberflächen-Glycoproteinen ihrer Beute ermöglicht ¹²⁸. Weniger spezifische Mechanismen hängen mit den Besonderheiten der mikrobiellen Beute zusammen: so werden gramnegative Bakterien aufgrund ihrer reduzierten Zellwand einfacher von Protozoen aufgeschlossen und lysiert, andere Organismen bilden besonders kleine oder besonders große, filamentöse Formen aus ¹²⁹, so dass sie aufgrund ihrer Größe nicht von Protozoen aufgenommen werden können. Ein weiterer Grund für die Selektivität liegt in der Koevolution von Beute und Räuber. So produzieren einige Bakterien Toxine ¹³⁰, die Protozoen schädigen, spezielle Kapseln oder Adaptationen der Zellwand, die die Aufnahme durch Protozoen behindern, oder hüllen sich schlicht in eine extrazelluläre Matrix ein, um sich der Predation zu entziehen ¹³¹. Ein Organismus der über keinen dieser Schutzmechanismen verfügt, ist somit gegenüber solchen mit einer dieser Adaptationen im Nachteil.

Im Falle von *Alcanivorax borkumensis* ist ausser einer Produktion extrazellulärer Polysaccharide in Zusammenhang mit der Biofilmbildung keiner dieser Abwehrmechanismen bekannt ⁵⁵. Obwohl marine Biofilme einen gewissen Schutz gegen Predation bieten, handelt es sich bei ihnen gleichzeitig auch um eine sehr hohe Konzentration an Biomasse in einem für Protozoen relativ nährstoffarmen Habitat. Somit bieten Biofilme ein ausgezeichnetes Ziel für Protozoen, da sie auf diesen durch Grazing effizienter Nahrung aufnehmen können und gleichzeitig Energie für die Jagd auf freilebende oder motile Bakterienzellen sparen ¹³².

Biotechnologische Konsequenzen der Predation

Um die Effekte des Grazings auf den marinen Ölabbau quantitativ zu bestimmen wurde eine zweite Mikrokosmenstudie unter Verwendung der bereits eingesetzten Kombination aus Ölbindemitteln und Langzeitdüngern durchgeführt. Zusätzlich zu X-Oil wurde ein zweites Ölbindemittel mit höherer Affinität zu Kohlenwasserstoffen eingesetzt. Durch Einsatz des transkriptionshemmenden Giftstoffes Cycloheximid wurden in einigen Ansätzen sämtliche eukaryotischen Predatoren eliminiert, wobei das Gift in einigen Ansätzen sofort, in anderen erst nach drei Wochen zugegeben wurde. Jedoch zeigten sich zwischen allen drei Ansätzen nur relativ geringe Unterschiede: So waren die bakteriellen Zellzahlen in allen sechs Mikrokosmen über den gesamten Versuchsablauf relativ gleich hoch, nur der Ansatz, welcher mit X-Oil versetzt und zu Versuchsbeginn mit Cycloheximid versetzt wurde, zeigt kurzfristig höhere Zellzahlen. Die Respirationsrate war in den mit X-Oil behandelten Mikrokosmen höher als in den mit dem aus Polypropylenfasern bestehenden Bindemittel SuperM versetzten. Jedoch traten keine signifikanten Unterschiede der Respiration in Zusammenhang mit der Zugabe von Cycloheximid auf. Ein Vergleich der Ölrückstände zeigte jedoch, dass lediglich in den Ansätzen WA und WC, in den kein oder erst zu einem späten Versuchszeitpunkt Cycloheximid zugegeben wurde, eine um bis zu 50% geringere relative Konzentration an n-Alkanen vorlag.

Die relativen Konzentrationen der untersuchten aromatischen Kohlenwasserstoffe waren in allen Ansätzen gleich hoch. Somit konnte durch dieses Experiment kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsansätzen festgestellt werden. Dies könnte auf die geringe Größe der Mikrokosmen zurückzuführen sein, die für das Wachstum von Protozoen hinderlich waren. Jedoch sind der Versuchsgröße durch die Giftigkeit des Cyclohexids Grenzen gesetzt.

Ein erstaunlicher Unterschied konnte zwischen den beiden Ölbindemitteln, X-Oil, welches aus Textilabfällen, und SuperM, welches aus Polypropylen besteht, festgestellt werden: So zeigten Mikrokosmen, denen SuperM zugegeben wurde, eine in der Regel zwischen 30 bis 40% geringere Respiration sowie keine Emulsionsbildung, was materialbedingt auf die circa 400% höhere Affinität des Materials zum Öl zurückzuführen sein könnte. Diese Eigenschaft hat zwei Konsequenzen für die Verwendung dieses Materials: So scheint SuperM zwar gut für die Bindung von Öl zu sein, aber gleichzeitig auch nicht förderlich für die Bioremediation, da das Öl nicht als Öl-in-Wasser-Emulsion freigesetzt und durch die geringere Oberflächenvergrößerung schlechter abgebaut wird. Gleichzeitig bietet eine geringere Emulsionsbildung eine geringere Angriffsmöglichkeit für räuberische Protozoen. Dennoch zeigen diese unterschiedlichen Verhaltensweisen der beiden Ölbindemittel, dass nicht nur die Umweltbedingungen, die vorhandene mikrobielle Gemeinschaft und die Zusammensetzung des abzubauenen Schadstoffs, einen Einfluss auf die Bioremediation haben, sondern auch technische Parameter wie zum Beispiel das Ölbindemittel.

Eine weitere Erklärung für die geringfügigen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsansätzen sind in einem anderen Zusammenhang zu suchen: So berichtet Head, dass Predation auf vielen verschiedenen Ebenen stattfinden kann: neben Protozoen treten auch Bacteriophagen auf, die ebenfalls eine Kontrolle der Biomasse durch Lysis der Bakterienzellen ausüben²⁷. In diesem Zusammenhang zeigte der Mesokosmenversuch eine weitere Ebene der Predation: So wurden über einen Zeitraum von sieben Tagen im Mesokosmos I, innerhalb derer die Zahl der Protozoen relativ niedrig war, die 16S rRNA von *Bacteriovorax* sp. nachgewiesen. Dieser Vertreter der *Bdellovibrionaceae* ist ein äußerst effektives räuberisches Bakterium, das sich ausschließlich von anderen Bakterien ernährt und somit ebenfalls zur Predation beiträgt³⁵. Da es nur durch Zugabe von Antibiotika eliminieren lässt, die auch die übrige mikrobielle Gemeinschaft stark schädigen würden, ist es nicht möglich, diese Art der Predation zu verhindern.

Diese Ergebnisse zeigen, dass selbst unter Vermeidung der Predation durch Protozoen andere Organismen oder Viren ihren Platz einnehmen würden. Diese Redundanz, die auch schon in Zusammenhang mit den mikrobiellen Gemeinschaften in Bezug auf den Abbau einzelner Substrate angesprochen wurde, ist ein weiterer Beweis für die bemerkenswerte Plastizität und Funktionalität des Ökosystems Meer^{69, 118, 119}. Es bleibt festzuhalten, dass Predation offensichtlich nicht zu vermeiden ist. Andererseits hat dieser wichtige Kontrollmechanismus auch erhebliche Vorteile, da nicht nur überschüssige Biomasse reduziert wird, sondern auch Nährstoffe zurück in das System gelangen. So berichten drei Studien von positiven Auswirkungen des Grazings auf die Biodegradation von Toluol und Alkylbenzol^{133 - 135}. Neben der Reduktion von Biomasse und der Rückführung von Nährstoffen konnten diese positiven Auswirkungen unter anderem auf eine Beeinflussung des Redoxpotenzials und der physikalischen sowie chemischen Eigenschaften des Ökosystems¹³⁴ zurückgeführt werden.

Durch Mattison et al. konnte ferner eine Exkretion von Acetat durch Flagellaten während des Grazings nachgewiesen werden, welches nicht nur einen Einfluss auf den pH-Wert und das Redoxpotenzial des umgebenden Mediums hat sondern auch als Substrat für Mikroorganismen dient. Hierbei wurde insbesondere ein Zusammenhang zu Denitrifikationsprozessen hergestellt, bei denen Acetat als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator für denitrifizierende Bakterien dient¹³⁵.

Offensichtlich gehen die Interaktionen zwischen Prokaryoten und Eukaryoten im Falle des marinen Kohlenwasserstoffabbaus über eine simple Räuber- und Beutebeziehung hinaus und stehen der Komplexität der mikrobiellen Interaktionen, die für die Biodegradation von Öl im Meer nötig sind, in nichts nach. Wie die oben präsentierten Ergebnisse zeigen, haben diese Interaktionen messbare Auswirkungen auf diesen wichtigen Prozess, so dass weitere Untersuchungen dringend notwendig sind um ein vollständiges Verständnis der Ökologie des marinen Ölabbau zu erlangen.

4.7 Fazit

- Anhand von DNA-Fingerprinting-Analysen einer Mikrokosmenstudie konnte gezeigt werden, dass eine Kontamination des Meerwassers zur Bildung einer von *A. borkumensis* dominierten Mikroorganismengemeinschaft innerhalb zweier Wochen führt, eine Bioaugmentation mit diesem Organismus konnte die für diesen Prozess nötige Zeit um 67% reduzieren. Eine Analyse der Ölrückstände in den Mikrokosmen zeigte eine um 75% verbesserte Reduzierung von linearen und aromatischen Kohlenwasserstoffen von Mikrokosmen, in denen Bioaugmentation stattfand.
- Die Ergebnisse einer Mesokosmenstudie haben gezeigt, dass eine biotechnologische Lösung des Problems von Ölverschmutzungen prinzipiell mit einfachen Mitteln umgesetzt werden kann. Die verwendete Methode basiert auf der Bindung von Öl mittel synthetischer und biologischer Bindemittel und der Einleitung und Unterstützung des biologischen Ölabbau. Im Versuch wurden 2,5 Liter Bunker C – Schweröl, einer der gefährlichsten und häufigsten Schadstoffe im Meer, vollständig aus einer Wassersäule von 500 l entfernt, ohne das eine Toxizität oder Ölrückstände im Mesokosmenwasser nachgewiesen werden konnten.
- Eine Analyse der Mikrobengemeinschaften während des Mesokosmenversuches zeigte, dass bis zu sieben verschiedene Bakterienarten mit Verwandtschaft zu ölabbauenden Mikroorganismen vorhanden sind. Neben Verwandten der bereits in verschiedenen Fachartikeln aufgeführten *Thalassolituus oleivorans*, *Phaeobacter inhibens*, *Terasakiella pusilla* und *Alcanivorax borkumensis* konnten auch drei bislang nur peripher mit dem Ölabbau in Verbindung gebrachte Bakterien identifiziert werden. Dabei handelte es sich um verwandte Organismen von *Thalassospira lucentensis*, *Lutibacterium annuloederans* sowie *Yeosuana aromativorans*. Hierbei ist insbesondere der letztgenannte Organismus über den gesamten Versuchsablauf nachweisbar gewesen.

- Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu bisherigen Studien, die *Cycloclasticus sp.* als dominantesten Abbauer von aromatischen Kohlenwasserstoffen definieren. Dies deutet eine funktionelle Redundanz der marinen Mikroorganismen in Hinblick auf die Verwertung dieser Stoffe hin.
- Unter Verwendung der Biofilmbildung von *Alcanivorax borkumensis* wurde eine Konservierungsmethode für Biomasse dieses Organismus entwickelt. Durch Verwendung von Dimethylsulfoxid und Gefrieren bei - 80°C konnte Biomasse mindestens drei Monate lang gelagert werden, wobei nicht nur lebensfähige Zellen sondern auch die Fähigkeit zur Emulsionsbildung nachweisbar waren.
- Im Rahmen der Mesokosmenstudie konnte ein intensives Grazing durch Protozoen beobachtet werden. Zellzählungen und Respirationmessungen zeigten ein paralleles Wachstum von Protozoen bei gleichzeitiger Stagnation des bakteriellen Wachstums und Reduktion der Gesamtrespiration. Mittels Mikroskopie und molekularbiologischen Untersuchungen wurden Flagellaten, Ciliaten und Amöben nachgewiesen, deren Populationen ebenfalls einer eigenen Dynamik unterliegen. Einige dieser Ciliaten wiesen Ähnlichkeiten zu 1974 in ölkontaminiertem Wasser beobachteten Protozoen auf. Besonders hohe Konzentrationen dieser Einzeller bildeten sich in unmittelbarer Nähe von Biofilmen, die auf emulgiertem Öl wuchsen.
- Neben Protozoen wurde anhand von Fingerprinting-Methoden RNA des parasitischen Bakteriums *Bacteriovorax sp.* nachgewiesen. Dies zeigt, dass eine Predation der Biomasse in den Mesokosmen sowohl auf bakterieller als auch auf eukaryotischer Ebene stattfand.
- Predationsmikrokosmen, in denen Protozoen mittel selektiver Giftstoffe eliminiert wurden zeigten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zwar höhere Respirationsraten und bakterielle Zellzahlen, jedoch kaum Unterschiede in der Zusammensetzung von Ölrückständen.

Im Gegensatz zu den etablierten mechanischen und chemischen Methoden, welche in ihrer Effizienz und technischen Umsetzung bereits optimiert und ausgereizt sind, ist die Biotechnologie erst am Anfang des Weges hin zu einer anwendbaren Strategie für den Schutz der marinen, aquatischen und terrestrischen Ökosysteme. Dieser Bereich der Wissenschaft ist nicht als Konkurrenz, sondern als Ergänzung zu den bereits vorhandenen Methoden zu sehen. Insbesondere in der Bekämpfung von Ölverschmutzungen im Meer bestehen viele Lücken im Katalog der vorhandenen Massnahmen, die mithilfe der Biotechnologie geschlossen werden können, um das Meer zu schützen. Nur in Einklang mit der Lebensgemeinschaft des Meeres, die das Resultat von vielen Millionen Jahren der Evolution ist, kann der Mensch die von Menschen verursachte Umweltverschmutzung bekämpfen.

5 Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Kenneth N. Timmis dafür danken, dass er mir die Möglichkeit dieser Doktorarbeit und darüber hinaus den Freiraum gegeben hat, diese zu entwickeln. Der DFG, dem Alfred-Wegener Institut, dem Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, sowie der TU Braunschweig gebührt großer Dank für die Finanzierung und konsequente Förderung dieses Projektes. Insbesondere das Alfred Wegener Institut bzw. die Biologische Anstalt Helgoland seien in diesem Zusammenhang erwähnt, deren unbürokratische und allzeit professionelle Kooperation von entscheidender Bedeutung waren. Besonderer Dank gebührt auch Herrn Joachim Hellmann, der mit großem Interesse und Enthusiasmus diese Arbeit nach Kräften unterstützt und begleitet hat.

Ich danke besonders Dr. Manfred Nimtz und Dr. Michail M. Yakimov, die mir mit den gaschromatographischen Analysen geholfen haben, Dr. Jakob Pernthaler, der wichtige Hilfestellung bei der Methode FISH leistete, und Dr. Brian Tindall, dessen Wissen sowie Ideen um die Lagerung von Biomasse für die Entwicklung der Lagerungsmethode entscheidend waren.

Mein herzlichster Dank gilt den vielen Freunden und Kollegen von der Biologischen Anstalt Helgoland: Brigitte Rauch, Karl-Walter Klings, Andreas Wagner, Kristine Carstens, Margret Krüß, Dr. Erik Hagmeier und Dr. Alexandra Kraberg. Besonderer Dank gebühren Britta Knepfelfkamp und Hilke Döpke, die mir viele wichtige Tipps und Tricks für die Arbeit im Labor gegeben haben.

Neben der wissenschaftlichen Unterstützung möchte ich mich aber auch für die gute Stimmung und die Atmosphäre im und außerhalb des Labors bei den Bewohnern des Arthur Hagmeier – Hauses und der Kaserne, vor allem bei Kerstin Pick, Thomas Hasenklöver, Ivana Moschella, Andreas Lück, Christina Gebühr und Johanna Sophie Vogt sowie meinem guten Freund Oke Zastrow bedanken. Von ganzem Herzen jedoch danke ich Dr. Antje Wichels und Dr. Melanie Sapp, die mir nicht nur die Fingerprintingmethoden DGGE und RISA beigebracht haben, sondern auch durch ihre kompetente und gleichzeitig sympathische und freundliche Art bei der Realisierung dieses Projektes geholfen haben.

Nicht minder gedankt sei meinen Braunschweiger Kollegen, Tanya Chernikova, Manuel Ferrer, Olga Golshina, Núria Jimenez, Birgit Jung, Oleg Kotsyurbenko, Annette Krüger, Olivier N´Gatchou Djao und Agnes Waliczek. Besonders hervorheben möchte ich hierbei Dr. Taras Nechitaylo, der mir und meinen Kollegen allzeit mit Rat und Tat zur Seite steht und Angelika Arnscheidt, die mit unermüdlichem Einsatz und großer Kompetenz nicht nur mir sondern auch meinen Kollegen die Arbeit ermöglicht. Mein besonderer Dank gilt Dr. Gunnar Gerds und Dr. Peter Golyshin: Beide sind nicht nur herausragende und äußerst kompetente Wissenschaftler sondern waren auch gute Betreuer, deren Rat und Hinweise meine Arbeit immer positiv beeinflusst haben. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft und die mikrobielle Ökologie im Besonderen haben mich immer beeindruckt und motiviert. Beide haben mir alles über diesen Bereich der Biologie beigebracht, aber gleichzeitig auch mein Interesse an Mikroorganismen und an der Ökologie des Meeres immer wieder bestärkt.

Zutiefst zu Dank verpflichtet jedoch bin ich meinem besten Freund Gero Schmidt und meiner Familie: meinem Bruder Jörn und meinen Eltern Bernhard und Regina Gertler, die mich seit meiner Jugend immer auf meinem Weg zur Wissenschaft unterstützt und ermutigt haben. Nur durch ihr Verständnis und ihre Hilfe konnte bis an diesen Punkt gelangen.

6 Literaturverzeichnis:

- 1: Link P.M.; Gefährdungspotentiale von Ölverschmutzungen durch Schiffshavarien in der Nordsee dargestellt am Beispiel der *Amoco Cadiz* und der *Pallas*; Diplomarbeit, Technische Universität Hamburg (2000)
- 2: Kruse K., Schmid B.; Fast schon Sabotage; Der Spiegel 47/1998, 22-25 (1998)
- 3: Niendorf J.: Eine Ölpest kann man nicht reparieren - Umweltschützer fordern Konsequenzen aus der "Pallas"-Havarie / CDU und FDP in Kiel beantragen Untersuchungsausschuß (1998), Berliner Zeitung, 11. 12. 1998
- 4: Latsch G., Thielke T.; Wurstwagen umgefallen; Der Spiegel 24/2000, 111 (2000)
- 5: Peak Oil - Das Ende des billigen Erdöls, www.peak-oil.de (2007)
- 6: Douglas-Westwood M.; The World Oil Supply Report 2003 - 2050 - Die Zukunft der globalen Ölproduktion" Ausgabe 2003, www.peak-oil.de (2007)
- 7: Huijer, K.; Trends in Oil Spills from Tanker Ships 1995 – 2004; International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF), London, U.K. ; www.itopf.com (2005)
- 8: Clark, R.B.; Kranke Meere? Verschmutzung und ihre Folgen; Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag (1992)
- 9: Heideloff, C.: ISL Shipping Statistics and Market Review (2004)
- 10: Bundesstelle für Seeunfalluntersuchung, Jahresstatistik 2002 – 2003 (2004)
- 11: Corbett J.J., Koehler H.W.; Updated emissions from ocean shipping; *Journal of Geophysical Research*, Vol. 108 (2003)
- 12: National Research Council (NRC); Oil in the Sea, Inputs, fates and effects, Washington, DC, National Academy Press (1985)
- 13: Newman, P.J., Agg A.R.; Environmental protection of the North Sea; Oxford, Heinemann Professional Publications (1988)
- 14: Brakstad O.G., Lodeng A.G.; Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea. *Microb Ecol.*; 49(1):94-103. (2005)
- 15: Freedman, B.; Oil pollution,; *Environmental Ecology*, San Diego, CA, Academic Press, S. 135-158. (1989)
- 16: van Bernem, K.H., Lübke T.: Öl im Meer, Katastrophen und langfristige Belastungen; Darmstadt, Wissenschaftliche Buchgesellschaft (1997)
- 17: International Tanker Owners Pollution Federation (ITOPF); Fate of marine oil spills; London, U.K. ; www.itopf.com (2004)

- 18: Medina-Bellver J.I., Marín P., Delgado A., Rodríguez-Sánchez A., Reyes E., Ramos J.L., Marqués S.; Evidence for *in situ* crude oil biodegradation after the *Prestige* oil spill; *Environ Microbiol*, 10: 1462 – 69 (2005)
- 19: Ahlhorn, F., Breves W., Götze T., Koch B., Möhring T.; Fiktiver Frachterunfall vor Wangerooge; Oldenburg, Projektbericht Marine Umweltwissenschaften der Universität Oldenburg (1996)
- 20: Pasila A. ; A biological oil adsorption filter; *Mar Pollut Bull.*, 49(11-12):1006-12. (2004)
- 21: Suni S., Kosunen A.L., Hautala M., Pasila A., Romantschuk M. ; Use of a by-product of peat excavation, cotton grass fibre, as a sorbent for oil-spills; *Mar Pollut Bull.*, 49(11-12):916-21 (2004)
- 22: Wei Q.F., Mather R.R., Fotheringham A.F., Yang R.D. ;Evaluation of nonwoven polypropylene oil sorbents in marine oil-spill recovery; *Mar Pollut Bull.* , 46(6):780-3. (2003)
- 23: Gunkel, W.; Ölverunreinigung der Meere und Abbau der Kohlenwasserstoffe durch Mikroorganismen; Angewandte Mikrobiologie der Kohlenwasserstoffe in Industrie und Umwelt, Esslingen, Expert Verlag, S. 18-36. (1988)
- 24: Gunkel, W., Gassmann, G. Oppenheimer C.H. , Dundas L. ; Preliminary results of baseline studies of hydrocarbons and bacteria in the North Sea: 1975, 1976 and 1977; *Resistencia a los Antibioticos y Microbiologia marina*, VI. Congreso Nacional Microbiologia, 6.-9.7., Santiago de Compostela, S. 223-247. (1980)
- 25: Lindstrom J.E., Prince R.C., Clark J.G., Grossman M.J., Yeager T.R., Braddock J.F., Brown E.J., Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. *Appl Environ Microbio*, 57: 2514-2522 (1991)
- 26: McKew B.A., Coulon F., Osborn A.M., Timmis K.N., McGenity T.J.; Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK.; *Environ Microbiol*, 9:165-176. (2007)
- 27: Head IM, Jones DM, Roling WF: Marine microorganisms make a meal of oil; *Nat Rev Microbiol*, 4:173-182. (2006)
28. Söhngen, N. L.; Benzin, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroben; *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2* **37**, 595–609 (1913).
- 29: Atlas R.M.; Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective; *Microbiological Reviews*, 45, 180-209 (1981)
- 30: Gunkel, W.; Bacteriological investigations of oil-polluted sediments from the Cornish coast following the Torrey Canyon disaster; *Helgol. Wiss. Meeresunters.* 17:151-158. (1968)
- 31: Atlas, R. M., Roubal G., Haines J.; Biodegradation of hydrocarbons in mousse from the IXTOC-I well blowout; Ann Arbor Science Publications, Inc., Ann Arbor, Mich. (1980)
- 32: Atlas, R. M., Bartha R.; Degradation and mineralization of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorus; *Biotechnol. Bioeng.* 14:309-317. (1972)

- 33: van Beilen J.B., Li Z. Duetz W.A., Smits T.H.M., Witholt B.; Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment; *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP*, 58: 427-440 (2003)
- 34: van Beilen J.B., Marin M.M., Smits T.H., Rothlisberger M., Franchini A.G., Witholt B., Rojo F; haracterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis*; *Environ Microbiol*, 6:264-273. (2004)
- 35: Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J.; Brock Biology of Microorganisms; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (2001)
- 36: Röling, W. F. M. ; Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil; *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2603–2613 (2004).
- 37: Röling, W. F. M.; Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation; *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5537–5548 (2002).
- 38: Röling, W. F. M., Couto de Brito, I. R., Swannell, R. P. J. & Head, I. M. Response of archaeal communities in beach sediments to spilled oil and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2614–2620 (2004).
- 39: Swannell R.P.J., Lee K., McDonagh M.; Field Evaluations of Marine Oil Spill Bioremediation; *Microbiological Reviews*, 60 No. 2, 342–365 (1996)
- 40: Bragg, J. R., Prince R. C., Harner E. J., Atlas R. M.; Bioremediation effectiveness following the Exxon Valdez spill; p.; *Proceedings of the 1993 Oil Spill Conference. American Petroleum Institute*, Washington, D.C. , 449–454 (1993)
- 41: U.S. Congress, Office of Technology Assessment; Bioremediation for Marine Oil Spills—Background Paper; *OTA-BP-O-70*, Washington, DC: U.S. Government Printing Office (1991).
- 42: Pritchard, P. H., Mueller J. G., Rogers J. C., Kremer F. V., Glaser J. A.; Oil spill Bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill in Alaska; *Biodegradation* 3:315–335. (1992)
- 43: Braddock, J.F., Lindstrom, J.E., Brown, E.J.; Distribution of hydrocarbon degrading Microorganisms in sediments from Prince William Sound, Alaska, following the Exxon Valdez oil spill; *Mar. Pollut. Bull.* 30, 125–132. (1995)
- 44: Head I.M., Swannell R.P.J.; Bioremediation of petroleum hydrocarbons in marine habitats; *Current opinion in biotechnology*, 10, 234 – 239 (1999)
- 45: Smith, V.H.; Implications of resource-ratior theory for microbial ecology; *Adv. Microb. Ecol.*, 13, 1 – 37 (1993)
- 46: Xu R., Lau A.N., Lim Y.G., Obbard J.P.; Bioremediation of oil-contaminated sediments on an intertidal shoreline using a slow-release fertilizer and chitosan; *Mar Pollut Bull.* 2005;51(8-12):1062-70.
- 47: Thompson I.P., van der Gast, C.J., Ciric, L., Singer, A.C.; Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection; *Environmental Microbiology*, 7(7), 909–915 (2005)

- 48: Hara A, Syutsubo K, Harayama S; *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation; *Environ Microbiol.* 5(9):746-53 (2003)
- 49: Harayama S, Kasai Y, Hara A.; Microbial communities in oil-contaminated seawater; *Curr Opin Biotechnol.* 15(3):205-14 (2004)
- 50: Yakimov MM, Denaro R, Genovese M, Cappello S, D'Auria G, Chernikova TN, Timmis KN, Golyshin PN, Giluliano L.; Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons; *Environ Microbiol.* 2005 Sep;7(9):1426-41 (2005)
- 51: Kasai Y, Kishira H, Harayama S.; Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment; *Appl Environ Microbiol.* 68(11):5625-33 (2002)
- 52: MacNaughton, S. J., J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y. J. Chang, D., White C.; Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill; *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3566–3574. (1999)
- 53: Kasai Y., Kishira H., Sasaki T., Syutsubo K., Watanabe K., Harayama S.; Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water; *Environ Microbiol.* 4:141-147. (2002)
- 54: Yakimov M.M., Golyshin P.N., Lang S., Moore E.R., Abraham W.R., Lunsdorf H., Timmis K.N.; *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactantproducing marine bacterium; *Int J Syst Bacteriol.* 48:339-348 (1998)
- 55: Schneiker S., Martins dos Santos V.A., Bartels D., Bekel T., Brecht M., Buhrmester J., Chernikova T.N., Denaro R., Ferrer M., Gertler C. et al.; Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbondegrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*; *Nat Biotechnol.* 24:997-1004. (2006)
- 56: Abraham WR, Meyer H, Yakimov M.; Novel glycine containing glucolipids from the alkane using bacterium *Alcanivorax borkumensis*; *Biochim Biophys Acta.* 31;1393(1):57-62. (1998)
- 57: Sabirova J.S., Ferrer M., Lunsdorf H., Wray V., Kalscheuer R., Steinbuchel A., Timmis K.N., Golyshin P.N.; Mutation in a “tesBlike” hydroxyacyl-coenzyme A-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2; *J Bacteriol.* 188:8452-8459 (2006)
- 58: Yakimov M.M., Timmis K.N., Golyshin P.N., Obligate oil degrading bacteria, *Current Opinion in Biotechnology.* 18:257–266 (2007)
- 59: Fernandez-Martinez J., Pujalte M.J., Garcia-Martinez J., Mata M., Garay E., Rodriguez-Valera F.; Description of *Alcanivorax venustensis* sp. nov. and reclassification of *Fundibacter jadensis* DSM 12178T (Bruns and Berthe-Corti 1999) as *Alcanivorax jadensis* comb. nov., members of the emended genus *Alcanivorax*; *Int J Syst Evol Microbiol.* 53:331-338 (2003)
- 60: Liu C., Shao Z.; *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkanedegrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment; *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:1181-1186. (2005)

- 61: Dutta T.K., Harayama S.; Biodegradation of n-alkylcycloalkanes and n-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. strain MBIC 4326; *Appl Environ Microbiol*, 67:1970-1974. (2001)
- 62: Yakimov M.M., Giuliano L., Denaro R., Crisafi E., Chernikova T.N., Abraham W.R., Luensdorf H., Timmis K.N., Golyshin P.N.; *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons; *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:141-148. (2004)
- 63: Yakimov M.M., Giuliano L., Gentile G., Crisafi E., Chernikova T.N., Abraham W.R., Lunsdorf H., Timmis K.N., Golyshin P.N.; *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water; *Int J Syst Evol Microbiol*, 53:779-785. (2003)
- 64: Golyshin P.N., Chernikova T., Abraham W.R., Luensdorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M.; *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons; *Int J Syst Bacteriol*, 52:901-911. (2002)
- 65: Dyksterhouse S.E., Gray J.P., Herwig R.P., Lara J.C., Staley J.T.: *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments; *Int J Syst Bacteriol*, 45:116-123. (1995)
- 66: Dahlmann, G.; Characteristic Features of Different Oil Types in Oil Spill Identification; Berichte des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie Nr. 31/ 2003 Bundesamt für Schifffahrt und Hydrographie (BSH), Hamburg, Germany; (www.bsh.de) (2003)
- 67: Coulon F., McKew B.A., Osborn A.M., McGenity T.J., Timmis K.N.; Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters; *Environ Microbiol*, 9:177-186. (2007)
- 68: Gerdes B., Brinkmeyer R., Dieckmann G., Helmke E.; Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea-ice; *FEMS Microbiol Ecol*, 53:129-139. (2005)
- 69: Loreau M., Naeem S., Inchausti P., Bengtsson J., Grime J.P., Hector A., Hooper D.U., Huston M.A., Raffaelli D., Schmid B., Tilman D., Wardle D.A.; Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges; *Science*, 26:294(5543):804-8. (2001)
- 70: Gunkel, W.; Experimentell-ökologische Untersuchungen über die limitierenden Faktoren des mikrobiellen Ölabbaues in marinem Milieu; *Helgol. Wiss. Meeresunters.* 15:210- 224. (1967)
- 71: Pernthaler J.; Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications; *Nature Reviews Microbiology* 3, 537–546 (2005),
- 72: Grasshoff, K.; Sauerstoffbestimmung nach Winkler: Methoden der Meeresbiologischen Forschung, VEB G. Fischer Verlag, Jena, 19-22. (1968)
- 73: Wichels A., Hummert C., Elbrächter M., Luckas B., Schütt C., Gerds G., Bacterial diversity in toxic *Alexandrium tamarense* bloom off the Orkney Isles and the Firth of Forth. *Helgoland Mar Res* 58:93-103, (2004)
- 74: Ranjard L., Brothier E., Nazaret S.; Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking; *Appl Environ Microbiol.*;66(12):5334-9. (2000)

- 75: Ranjard L., Poly F., Lata J.C., Mougél C., Thioulouse J., Nazaret S.; Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability; *Appl Environ Microbiol.* ;67(10):4479-87. (2001)
- 76: Muyzer, G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G.; Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA; *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695–700. (1993)
- 77: Diez B., Pedros-Alio C., Marsh T.L., Massana R., Application of Denaturing Gradient Gel electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques; *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2942-2951 (2001)
- 78: Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.; Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2nd edn.; Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1989)
- 79: Muylaert K., Van Der Gucht K., Vloemans N., Meester L.D., Gillis M., Vyverman W.; Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes; *Appl Environ Microbiol.* 2002 Oct;68(10):4740-50.
- 80: Clarke K.R., Gorley R.N.; PRIMER 5 for Windows; PRIMER-E Ltd., Plymouth, UK (2001)
- 81: Clarke K.R., Warwick R.M.; Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation; PRIMER-E, Plymouth, UK (2001)
- 82: Hall, T.A. ; BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program Windows 95/98/NT; *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98. (1999)
- 83: Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Chaerun S.K.; Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; *Nucleic Acids Res*, 25:3389– 402. (1997)
- 84: Yakimov M.M., Giuliano L., Crisafi E., Chernikova T.N., Timmis K.N., Golyshin P.N.; Microbial community of a saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy); *Environmental Microbiology*, 4(5), 249–256 (2002)
- 85: Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.; MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.; *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. (2007)
- 86: Dutta T.K., Harayama S.; Biodegradation of n-alkylcycloalkanes and n-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. strain MBIC 4326; *Appl Environ Microbiol.* 67(4):1970-4. (2001)
- 87: Syutsubo K., Kishira H., Shigeaki H.; Development of specific oligonucleotide probes for the identification and in situ detection of hydrocarbon-degrading *Alcanivorax* strains; *Environmental Microbiology* 3(6), 371-379 (2001)
- 88: Brown, E.J., Braddock J.F.; Sheen Screen, a Miniaturized Most-Probable-Number Method for Enumeration of Oil-Degrading Microorganisms; *Appl Environ Microbiol.* 56, 3895-3896 (1990)

- 89: López-López A., Pujalte M. J., Benlloch S., Mata-Roig M., Rosselló -Mora R., Garay E., Rodríguez-Valera F.; *Thalassospira lucentensis* gen. nov., sp. nov., a new marine member of the α -Proteobacteria; *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1277–1283. (2002)
- 90: López M.A., Zavala-Díaz de la Serna F.J., Jan-Roblero J., Romero J.M., Hernández-Rodríguez C.; Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in a water pipeline in the Gulf of Mexico; *FEMS Microbiol Ecol.* 58(1):145-54. (2006)
- 91: Liu C., Wu Y., Li L., Ma Y., Shao Z.; *Thalassospira xiamenensis* sp. nov. and *Thalassospira profundimarum* sp. nov.; *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(Pt 2):316-20. (2007)
- 92: Gonzáles J., Moran M.A. ; Numerical Dominance of a group of Marine Bacteria in the α -Subclass of the Class *Proteobacteria* in Coastal Seawater; *Appl Environ Microbiol* 63: 4237-4242. (1997)
- 93: Eilers H., Pernthaler J., Peplies J., Glöckner F.O., Gerdts G., Amann R.; Isolation of Novel Pelagic Bacteria from the German Bight and Their Seasonal Contributions to Surface Picoplankton. *Appl Environ Microbiol* 67: 5134-5142. (2001)
- 94: Sapp M., Interactions of marine bacteria in the pelagic food web, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel (2006)
- 95: Eilers H., Pernthaler J., Amann R., Succession of Pelagic Marine Bacteria during Enrichment: a Close Look at Cultivation-Induced Shifts, *Appl Environ Microbiol.*, 66 4634–4640 (2000)
- 96: Elshahed M. S., McInerney M. J.; Is interspecies hydrogen transfer needed for toluene degradation under sulfate-reducing conditions?; *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 163–169 (2001).
- 97: Lim, E. L., Dennett, M. R. & Caron, D. A.; The ecology of *Paraphysomonas imperforata* based on studies employing oligonucleotide probe identification in coastal water samples and enrichment cultures; *Limnol. Oceanogr.* 44, 37–51 (1999).
- 98: Lau K.W.K., Ng C.Y.M., Jiangpin Ren, Lau S.C., Qian P-Y., Wong P., Lau T.C., Wu M.; *Owenweeksia hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the phylum 'Bacteroidetes'; *Int J Syst Evol Microbiol.* 55, 1051–1057 (2005)
- 99: Kwon K.K., Lee H.-S., Jung H.-B., Kang J.-H., Kim S.-J.; *Yeosuana aromativorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic marine bacterium belonging to the family *Flavobacteriaceae*, isolated from estuarine sediment of the South Sea, Korea; *Int J Syst Evol Microbiol.* 56, 727–732 (2005)
- 100: Chung W.K., King G.M.; Isolation, characterization, and polyaromatic hydrocarbon degradation potential of aerobic bacteria from marine macrofaunal burrow sediments and description of *Lutibacterium anuloderans* gen. nov., sp. nov., and *Cycloclasticus spirillensus* sp. nov; *Appl Environ Microbiol* 67:5585-5592. (2001)
- 101: Stolz A., Bürger S., Kuhm A., Kämpfer P., Busse H.-J.; *Pusillimonas noertemannii* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Alcaligenaceae* that degrades substituted salicylates, *Int J Syst Evol Microbiol.* 55, 1077 – 1081 (2005)
- 102: Harayama S., Kishira H., Kasai Y., Shutsubo, K.; Petroleum biodegradation in marine environments; *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 63–70. (1999)

- 103: Coulon F., McKew B.A., Osborn A.M., McGenity T.J., Timmis K.N.; Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters; *Environ Microbiol* 9:177-186. (2007)
- 104: Brakstad O.G., Bonaunet K.; Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0-5 °C) and bacterial communities associated with degradation; *Biodegradation* 17:71-82. (2006)
- 105: Cappello S., Denaro R., Genovese M., Giuliano L., Yakimov M.M.; Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on 'oil spill bioremediation' in mesocosms; *Microbiol Res* 162:185-190. (2007)
- 106: McKew B.A., Coulon F., Yakimov M.M., Denaro R., Genovese M., Smith C.J., Osborn A.M., Timmis K.N., McGenity T.J.; Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria; *Environmental Microbiology* 9(6), 1562–1571 (2007)
- 107: El Fantroussi S., Agathos, S.N.; Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?; *Current Opinion in Microbiology* 8:268–275 (2005)
- 108: Miyasaka T., Asami H., Watanabe K.; Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments; *Biodegradation* 17: 227–235 (2006)
- 109: Wright A.L., Weaver R.W., Fertilization for oil biodegradation in saltmarsh mesocosms; *Water, Air, and Soil Pollution* 156: 229–240 (2004)
- 111: Radwan S.S.; Al-Hasan R.H.; Salamah S.; Al-Dabbous S.; Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae; *International Biodeterioration and Biodegradation* 50, No.1, 55-59(5) (2002)
- 112: Urrestarazu M., Mazuela P.C.; Effect of slow-release oxygen supply by fertigation on horticultural crops under soilless culture; *Scientia Horticulturae* 106 484–490 (2005)
- 113: Rosenberg E., Legman R., Kushmaro A., Adlerb E., Abir H., Ron, E.Z.; Oil bioremediation using insoluble nitrogen source; *Journal of Biotechnology* 51 273-278 (1996)
- 114: Koren O., Knezevic V., Ron E.Z., Rosenberg E.; Petroleum Pollution Bioremediation Using Water-Insoluble Uric Acid as the Nitrogen Source; *Appl Environ Microbiol*, 69, No. 10, 6337–6339 (2003)
- 115: Ehrenreich P., Behrends A., Harder J., Widdel F.; Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria; *Arch Microbiol* 173 :58–64 (2000)
- 116: Rabus R., Wilkes H., Schramm A., Harms G., Behrends A., Amann R., Widdel F.; Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the b-subclass of Proteobacteria; *Environmental Microbiology* 1(2), 145–157 (1999)
- 117: Ivanova E., Chipeva V., Ivanova I., Dousset X., Poncelet D.; Encapsulation of lactic acid bacteria in calcium alginate beads for bacteriocin; *Journal of culture collections*, 3, , 53-58 (2002)

- 118: Griffiths, B. S. et al.; Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship; *Oikos* 90, 279–294 (2000).
- 119: Giller, P. S., Hillebrand, H., Berninger, U.-G.; Biodiversity effects on ecosystem functioning: emerging issues and their experimental test in aquatic environments; *Oikos* 104: 423–436. (2004)
- 120: Gerdt G., Wichels A., Döpke H., Klings K.-W., Gunkel W., Schütt C.; 40-year long-term study of microbial parameters near Helgoland (German Bight, North Sea): historical view and future perspectives; *Helgol Mar Res* 58:230–242 (2004)
- 121: Hirsch P., Bernhard M., Cohen S.S., Ensign J.C., Jannasch H.W., Koch A.L.; Life under conditions of low nutrient concentrations: group report, 1 Strategies of microbial life in extreme environments; In *Dahlem Konferenzen Life Sciences Research Report 13*. Shilo, M. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 357–372. (1979)
- 122: Elmhirst R.; Investigation on the effects of oil tanker discharge. *Rep. Scott. mar. biol. Ass.* 8-9 (1922).
- 123: Andrews A.R., Floodgate G.D.; Some observations on the interactions of marine protozoa and crude oil residues; *Marine Biol.*, 25, 7 – 12 (1975)
- 124: Calkins G.N.; Marine protozoa from Woods Hole; *Bulletin of the United States Fish Commission* 21:415-468, 1901 (2006)
- 125: Munson D.A., Paget T.A.; Distribution of *Acanthamoeba* in More and Less Polluted North Sea Coastal Sediments; *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53(S1), S12–S14 (2006)
- 126: Cox H.H.J., Nguyen T.T., Deshusses M.A.; Predation of bacteria by the protozoa *Tetrahymena pyriformis* in toluene-degrading cultures; *Biotechnology Letters* 21: 235–239, 1999.
- 127: Thingstad, T. F.; Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems; *Limnol. Oceanogr.* 45, 1320–1328 (2000).
- 128: Wooton, E.C., Zubkov M.V., Jones D.H., Jones R.H., Martel C.M., Thornton C.A., Roberts E.C.; Biochemical prey recognition by planktonic protozoa; *Environmental Microbiology* 9(1), 216–222 (2007)
- 129: Hahn M. W., Moore E. R. B., Höfle M. G. ; Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla; *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 25–35 (1999).
- 130: Matz C. *et al.*; Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates; *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1593–1599 (2004).
- 131: Hahn M. W., Lunsdorf H., Janke L.; Exopolymer production and microcolony formation by planktonic freshwater bacteria: defence against protistan grazing; *Aquat. Microb. Ecol.* 35, 297–308 (2004).
- 132: Caron, D. A. ; *The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates* Vol. 45 77–92 (Clarendon Press, Oxford, 1991).

- 133: Mattison R.G., Harayama S.; The predatory soil flagellate *Heteromita globosa* stimulates toluene biodegradation by a *Pseudomonas sp.*; *FEMS Microbiology Letters* 194 39-45 (2001)
- 134: Kota S., Borden R.C. Barlaz M.A.; Influence of protozoan grazing on contaminant biodegradation; *FEMS Microbiology Ecology* 29 179-189 (1999)
- 135: Mattison R.G., Taki H., Harayama S.; The Soil Flagellate *Heteromita globosa* Accelerates Bacterial Degradation of Alkylbenzenes through Grazing and Acetate Excretion in Batch Culture; *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 142–150 (2005)
- 136: Grasshoff K., Kremling K., Ehrhardt M., Anderson L.G.; Methods of Seawater Analysis. Wiley-VCH. (1999)
- 137: Dell'Anno A., Fabiano M., Duineveld G.C.A., Kok A., Danovaro R.; Nucleic acid (DNA, RNA) quantification and RNA/DNA ratio determination in marine sediments: comparison of spectrophotometric, fluorometric, and HighPerformance liquid chromatography methods and estimation of detrital DNA; *Appl Environ Microbiol.* 64(9):3238-45. (1998)
- 138: Reise K., Kolbe K., de Jonge V.N.; Makroalgen und Seegrasbestände im Wattenmeer. In: Lozán JL, Rachor E., Reise K., Westernhagen H., Lenz W.; Warnsignale aus dem Wattenmeer. Blackwell, Berlin (1994)
- 139: Wiltshire, K. H., Manly, B. F. J.; The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response; *Helgoland marine research* 58,269-273 (2004)
- 140: <http://de.wikipedia.org/wiki/Helgoland>
- 141: Wong LL.; Cytochrome P450 monooxygenases; *Curr Opin Chem Biol*; 2(2):263-8. (1998)
- 142: Guengerich F.P.; Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview; *J Biochem Mol Toxicol.* 21(4):163-8. (2007)
- 143: van Beilen J.B., Panke S., Lucchini S., Franchini A.G., Röthlisberger M., Witholt B.; Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes; *Microbiology* 147(Pt 6):1621-30. (2001)
- 144: van Beilen J.B., Funhoff E.G.; Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation; *Appl Microbiol Biotechnol*; 74(1):13-21.(2007)
- 145: Pieper D.H.; Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls; *Appl Microbiol Biotechnol* 67(2):170-91. (2005)
- 146: Ferrer M., Chernikova T.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N., Timmis K.N.; Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures; *Nat Biotechnol.* 21(11):1266-7. (2003)
- 147: Felsenstein, J.; PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2); *Cladistics* 5: 164-166. (1989)

Curriculum vitae

Name: Christoph Gertler

Adresse: Mauernstrasse 30, 38100 Braunschweig
Tel.: 0049-531-3496585

Geburtstag/-ort: 17.04.1978, Peine

Familienstand: ledig, keine Kinder

Eltern: Bernhard Gertler, Regina Gertler (geb. Brotzki)

Geschwister: Jörn Gertler

Schulbildung:

1983 – 87 Grundschule Broistedt
1987 – 90 Orientierungsstufe Lengede
1990 – 97 Gymnasium Gross Ilsede

Wehrdienst:

1997 – 98 Grundwehrdienst bei 6./192 PzGrenBtl., Ahlen/Westfalen
Juli/August 1997 Teilnahme am Katastrophenschutz Einsatz Frankfurt/Oder
August 1998 Fortbildung zum Unteroffizier der Reserve

Studium

1998 – 2003 Studium an der Technischen Universität Braunschweig
 Studienschwerpunkte: Mikrobiologie (Hauptfach), Zoologie (Nebenfach),
 Zellbiologie (Nebenfach)
Juli 2003 – März 2004 Diplomarbeit: "Konstruktion und Analyse adhäsiondefizienter Mutanten von
 Alcanivorax borkumensis"
Juni 2004 Diplom-Biologe

Studentische Tätigkeiten

2000 freiwilliges Praktikum an der Technischen Universität Braunschweig, Institut
 für Mikrobiologie; Proteomics von *P.aeruginosa*

2001 freiwilliges Praktikum an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung,
 Institut für Infektionsbiologie; Analyse von Pathogenitätsfaktoren von
 Streptococcus sp.

2002 freiwilliges Praktikum an der Technischen Universität Braunschweig/
 Galvanotechnik Kessel GmbH, Vechelde; Experimente zur Absorption von
 Schwermetallen durch Bakterien

2003 Betreuung des Praktikums „Ökologie der Felsküsten“, Technische Universität
 Braunschweig, Institut für Zoologie

Promotion

Seit Juli 2004 Tätigkeit als Doktorand am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung

2005 “Community Dynamics and "Ecogenomics" of Marine Heavy Fuel Oil (HFO) Degrading Organisms regarding Biostimulation and Bioaugmentation”; Poster auf den Konferenzen European Bioperspectives, Wiesbaden, 10. Mai und BlueBioNet Congress, Bremerhaven, 14. Juni 2005

Kenntnisse:

Sprachen: Englisch fließend in Wort und Schrift,
Französisch ausbaufähige Grundkenntnisse
Kleines Latinum

EDV: fundierte Kenntnisse der Programme Microsoft Word, Excel, PowerPoint, Ulead Photoimpact, Sigma Plot u.a.

Zusatzqualifikationen: Fernmelde- sowie vermessungstechnische Ausbildung (Bundeswehr)

Vereinstätigkeit: Aktiver Langstreckenläufer des TV Klein Ilsede von 1999 - 2008
Teilnahme an regionalen, nationalen und internationalen Wettkämpfen
Teilnahme an der Deutschen Marathon-Meisterschaft 2004, Hannover

Christoph Gertler